



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2015

**André Eduardo
Baptista de Oliveira
Marques**

**Estudo da Variação da Abundância e Diversidade de
Procariotas em Sedimentos Subsuperficiais
Marinhos**



**André Eduardo
Baptista de Oliveira
Marques**

**Estudo da Variação da Abundância e Diversidade de
Procariotas em Sedimentos Subsuperficiais
Marinhos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves da Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Principal do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao Filipe pela companhia e dedicação incondicionais.

Dedico-o ainda ao meu avô, que estaria orgulhoso de me ver concluir esta etapa.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Adelaide Pinho Almeida (presidente)

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Clara Araújo Sena da Silva (arguente)

Bolseira de Pós-doutoramento do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha (orientadora)

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Ângela Cunha, e co-orientador, Doutor Newton Gomes, por toda a disponibilidade, empatia, incentivo, auxílio e, fundamentalmente, pelas boas condições que forneceram para a realização desta dissertação.

Ao Laboratório de Estudos Moleculares de Ambientes Marinhos (LEMAM) e ao Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), da Universidade de Aveiro, pelo suporte matéria a este trabalho.

À equipa de investigação da IODP e ao Departamento de Geociências pelo fornecimento das amostras e por toda a informação que me colocaram ao dispor.

Ao Francisco, à Ana, à Vanessa, à Marina e restantes investigadores do LEMAM pelos conselhos, paciência e tempo que despenderam quando mais precisei deles.

À Ângela e à Ana Rita pelo companheirismo e boa disposição de sempre ao longo desta etapa.

À Catarina, à Marisa, ao Rafael, à Tatiana, ao Ricardo, ao Paulo, à Salomé e restantes amigos por toda a ajuda e incentivo.

Ao grupo EVO pela amizade, peripécias e história ao longo dos últimos anos.

Aos meus pais, irmã e restante família por me terem permitido alcançar este patamar.

Ao Filipe por ter estado a meu lado ao longo de todo este percurso e pela companhia, auxílio, apoio e tempo que prestou sem a exigência de qualquer condição.

palavras-chave

sedimentos subsuperficiais profundos, abundância de procariotas, *Bacteria*, DGGE

resumo

Os sedimentos marinhos subsuperficiais profundos são, atualmente, um ambiente ainda pouco conhecido do ponto de vista microbiológico, nomeadamente quanto aos processos metabólicos que nele têm lugar e quanto à sua possível influência nos ciclos biogeoquímicos. O acesso a amostras colhidas em sedimentos profundos, particularmente no âmbito dos programas IODP (International Ocean Discovery Program) e ECORD (European Consortium for Ocean Research Drilling) tem permitido recolher informação sobre a estrutura das comunidades de procariotas bem como sobre alguns dos fatores que regulam a sua distribuição e atividade. Este estudo teve como objetivo caracterizar a distribuição e a diversidade estrutural das comunidades de procariotas em sedimentos subsuperficiais profundos colhidos no Arco Izu-Bonin-Mariana, no mar das Filipinas, com recurso a métodos independentes de cultivo (PCR-DGGE) e à contagem de células por microscopia de epifluorescência. Os resultados apontam para a existência de comunidades de *Bacteria* e Archaea diversas. Os valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') calculados com base nos perfis de DGGE (*Bacteria*) foram significativamente mais elevados ($3,035 - 1,971$) nas camadas superficiais (< 140 mafm) do que nos sedimentos ($2,519 - 1,049$) correspondentes a profundidades superiores entre 163 e 879 mafm. A abundância máxima ($8,66 \times 10^6$ células.gps⁻¹) foi registada à profundidade de 67 mafm e valor mínimo ($2,26 \times 10^6$ células.gps⁻¹) foi observado em amostras colhidas a 879 mafm de profundidade. Abundância e diversidade apresentaram correlação negativa com a profundidade e com o teor de sulfato. Os resultados indicam que ao longo da coluna de sedimento se estabelecem comunidades de procariotas estruturalmente diferentes e adaptadas ao ambiente geoquímico prevalecente, nomeadamente em termos dos aceitadores de eletrões disponíveis. O estudo do microbioma destas amostras representativas do ambiente sedimentar subsuperficial profundo será continuado e detalhado, com recurso a técnicas de sequenciação avançada.

keywords

deep subsurface sediments, prokaryote abundance, *Bacteria*, DGGE

abstract

Deep marine subsurface sediments are still underexplored habitats, from the environmental microbiology perspective and little is known about the metabolic processes that take place there and on their possible influence on biogeochemical cycles. Samples from deep subsurface sediments collected in the context of the IODP (International Ocean Discovery Program) and ECORD (European Consortium for Ocean Research Drilling) consortium have provided insights on the diversity and structure of prokaryotic communities as well as some of the factors affecting their distribution and activity.

This study aimed to characterize the distribution and structural diversity of prokaryotic communities in deep subsurface sediments collected from the Arc Izu-Bonin-Mariana, in the Philippine sea, using methods of molecular analysis (PCR-DGGE) and cell counting by epifluorescence microscopy.

The results reveal the existence of structurally different *Bacteria* communities along the depth profile. The values of the diversity index Shannon-Weaver calculated based on the DGGE profiles of *Bacteria* were significantly higher ($1,971 < H' < 3,035$) near the surface (<140 mbsf (meters below sea floor)) than in deeper (163-879 mbsf) sediments ($1,049 < H' < 2,519$). The maximum abundance ($8,66 \times 10^6$ cells.gps⁻¹) was observed at a depth of 67 mbsf and the minimum value ($2,26 \times 10^6$ cells.gps⁻¹) was observed in samples corresponding to a depth of 879 mbsf. Abundance and diversity were negatively correlated with depth and with sulphate concentration.

The results indicate a succession of structurally different *Bacteria* assemblages along the depth profile, adapted to the prevailing geochemical environment, particularly in terms of availability of electron acceptors.

The study of the microbiome of these samples will be further detailed by advanced sequencing techniques.

Índice

Índice de figuras	ii
Índice de tabelas	iv
Índice de anexos	v
Índice de abreviaturas	vi
1. Introdução.....	1
1.1. A biosfera profunda	1
1.1.1. Sedimentos subsuperficiais profundos.....	1
1.1.2. Comunidades microbianas de sedimentos subsuperficiais profundos	2
1.2. Contribuição da biosfera profunda para os ciclos biogeoquímicos.....	8
1.3. Justificação do trabalho e objetivos	12
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Amostragem, preparação e caracterização físico-química das amostras	13
2.2. Análise da comunidade de <i>Bacteria</i> com base no DNA	14
2.2.1. Extração de DNA.....	14
2.2.2. Amplificação por <i>Nested PCR</i>	15
2.2.3. Análise por <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (DGGE)	17
2.3. Determinação da abundância total de procariotas.....	18
2.3.1. Extração das células	18
2.3.2. Recolha e coloração das células.....	19
2.3.3. Quantificação de procariotas por microscopia de epifluorescência	19
2.4. Análise de variação vertical.....	20
2.5. Análise estatística.....	21
3. Resultados.....	23
3.1. Diversidade estrutural de comunidades de <i>Bacteria</i>	23
3.2. Abundância de procariotas.....	28
3.3. Perfis verticais	30
3.4. Análise de correlação	31
4. Discussão	31
4.1. Diversidade estrutural das comunidades de <i>Bacteria</i>	31
4.2. Abundância e distribuição de procariotas	36
4.3. Conclusão.....	38
5. Referências	41

Índice de figuras

Figura 1. Adaptada de Kallmeyer et al. (15). Abundância total de procariotas por unidade de volume (cm^3) de sedimento, à profundidade de 1 mbsf, estimada com base em amostras do Oceano Pacífico.	3
Figura 2. Adaptada de Kallmeyer et al. (15). Concentração de células vs profundidade (mbsf). A amarelo e a azul estão representadas as concentrações de células nos giros oceânicos do Pacífico Sul e Pacífico Norte, respetivamente (41).....	4
Figura 3. Adaptada de Fry et al. (30). Representação dos principais grupos taxonómicos do domínio <i>Bacteria</i> em bibliotecas genómicas de sequências de genes 16S rRNA, obtidas em sedimentos subficiais profundos (0-503 mafm). Cada barra representa uma comunidade de um determinado local e profundidade em que os grupos taxonómicos estão representados por diferentes cores.	7
Figura 4. Adaptada de Fry et al. (30). Representação dos principais grupos taxonómicos do domínio <i>Archaea</i> em bibliotecas genómicas de sequências de genes 16S rRNA, obtidas em sedimentos subficiais profundos (0-6956 mafm). Cada barra representa comunidade de um determinado local e profundidade em que os grupos taxonómicos estão representados por diferentes cores.	8
Figura 5. Perfis de DGGE de fragmentos de genes de rRNA 16S de <i>Bacteria</i> amplificados a partir de DNA extraído das amostras de sedimentos. A vermelho estão assinaladas as bandas observadas apenas nos sedimentos mais superficiais (<67 mafm) e a amarelo estão representadas as bandas características dos sedimentos mais profundos (>879 mafm).....	23
Figura 6. PCO relativo à ordenação das amostras de acordo com os seus perfis DGGE. A castanho claro estão representadas as amostras superficiais (< 140 mafm), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.....	24
Figura 7. PCO relativo à ordenação de um subconjunto de amostras de acordo com os parâmetros físico-químicos com representação dos vetores relativos aos parâmetros que apresentaram significância estatística ($p \leq 0,1$) em correlação com a ordenação das amostras: alcalinidade, azoto, boro, bário, cálcio, potássio, magnésio, sódio e sulfato. A castanho claro estão representadas as amostras superficiais (< 140 mafm), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.....	26
Figura 8. Variação do log do índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') em função do log da profundidade (maf) das amostras de sedimento. A amarelo estão representadas as amostras superficiais (< 140 maf), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.	28
Figura 9. Variação log da concentração de células (células.gps^{-1}) em função do log da profundidade (maf) das amostras de sedimento. A amarelo estão representadas as amostras superficiais (< 140 maf), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.	29
Figura 10. Variação entre variáveis logaritimizadas abundância total de procariotas, índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), concentração de sulfato e concentração de bário em função do log da profundidade. Nos eixos das abcissas está representada a profundidade (maf) e nos eixos das ordenadas estão representadas a abundância total de procariotas (células.gps^{-1}) a vermelho, o índice de diversidade de <i>Bacteria</i> (H') a verde, a concentração de sulfato (mM) a amarelo e a concentração de bário (μM) a azul.....	31

Figura 11. Representação esquemática das correlações significativas entre a profundidade, concentração de células, índice de Shannon-Heaver (H') e parâmetros físico-químicos Ba, Mg, K, SO_4^{2-} , Na, N e alcalinidade. A verde estão representadas correlações positivas e a vermelho correlações negativas. 30

Índice de tabelas

Tabela 1. Abundância de <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e procariotas totais em sedimentos subsuperficiais profundos de diferentes regiões geográficas.	5
Tabela 2. <i>Primers</i> e parâmetros das reações de amplificação por <i>Nested PCR</i> . Antes de cada série de ciclos, a temperatura foi inicialmente elevada até 94 °C durante 5 min, para a primeira ronda e durante 4 min, para a segunda ronda de PCR e no final de cada série a temperatura foi estabelecida em 72 °C durante 10 min, para ambas as rondas, de modo a promover a elongação final (65).	17
Tabela 3. Valores do índice de Shannon-Weaver (H') para cada amostra.	27
Tabela 4. Concentração de células para cada amostra.	29
Tabela 5. Tabela representativa da Correlação de Spearman entre as variáveis: profundidade, concentração de células, índice de Shannon-Weaver (H') e parâmetros físico-químicos Ba, Mg, K, SO ₄ ²⁻ , Na, N e alcalinidade.	29

Índice de anexos

Anexo 1. Identificação das amostras colhidas para análises microbiológicas e respetiva caracterização físico-química total (64).	I
Anexo 2. Parâmetros analisados ou calculados para cada amostra. + representa a utilização da amostra no procedimento experimental indicado e - representa a sua não utilização.....	III
Anexo 3. Amostras utilizadas na extração de DNA e quantidade extraída de cada amostra.	IV

Índice de abreviaturas

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

gps - grama de peso seco

IODT - *International Ocean Discovery Program*

NOB - *Nitrite Oxidizing Bacteria*

ODP - *Ocean Drilling Program*

PBS - tampão fosfato salino

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RPM - rotações por minuto

SMTZ - sulphate-methane transition zone

SSP - subsuperficiais

maf_m – *metros abaixo do fundo do mar*

1. Introdução

1.1. A biosfera profunda

A biosfera profunda compreende os seres vivos, particularmente microrganismos, encontrados em sedimentos subsuperficiais profundos (SSP) até profundidades da ordem das centenas de metros abaixo do fundo oceânico, alcançando a crosta oceânica (1).

1.1.1. Sedimentos subsuperficiais profundos

Os sedimentos SSP só começaram a ser alvo de investigações microbiológicas aprofundadas a partir dos anos 90 do século passado, devido à dificuldade em se obter amostras não contaminadas e ao isolamento e cultivo de estirpes provenientes dessas amostras (2). No entanto, ZoBell e Anderson (3) em 1936 e Morita e ZoBell (4) em 1955 tinham já relatado a presença de procariotas em sedimentos marinhos de diversas profundidades, quer em zonas costeiras quer em sedimentos de oceano aberto.

O fundo marinho é um dos habitats mais inóspitos do planeta, devido à pressão hidrostática extrema, a rondar os 38 MPa e à baixa temperatura registada (sensivelmente 2°C) (5). Estas duas condições promovem a compactação dos sedimentos e redução da porosidade, tornando-os mais densos (6). Quimicamente, a diminuta concentração de oxigénio aliada à ausência de luz, falta de atividade fotossintética e consequente escassez de matéria orgânica, criam condições extremamente adversas à vida. Questionava-se, pois, a existência de organismos capazes de sobreviver neste tipo de ambiente, que era considerado como biologicamente inativo (5).

Os reduzidos fluxos de materiais e energia característicos do ambiente sedimentar subsuperficial profundo, impõem uma forte pressão seletiva sobre as formas de vida, especialmente quanto às vias metabólicas operadas (7,8). De facto, o baixo fluxo de energia poderá funcionar como um fator de seleção de comunidades procariotas altamente adaptadas, com uma baixa taxa metabólica

(9,10). O nitrato, o manganês, o sulfato e o dióxido de carbono são alguns dos aceitadores de elétrons mais frequentemente usados (11). Não obstante, este tipo de sedimentos é uma fonte fundamental de informação sobre a sua história de deposição sedimentar e alterações climáticas do passado (12).

1.1.2. Comunidades microbianas de sedimentos subsuperficiais profundos

Os dados disponíveis não permitem ainda estimar com rigor a contribuição relativa dos sedimentos SSP para a abundância total de procariotas na biosfera. As primeiras estimativas, realizadas por Whitman et al. (13), sugeriram que um terço de toda a vida da Terra se encontrava nos sedimentos do fundo marinho, apesar da maioria das amostras ter sido recolhida perto da linha da costa, o que implicava que grande parte do oceano não estaria representada. Segundo as primeiras estimativas, produzidas com base na relação entre a concentração de células e a profundidade em seis locais do Oceano Pacífico de profundidade até 600 m, a abundância total de procariotas nos sedimentos do substrato marinho seria de $3,8 \times 10^{30}$ células e a biomassa de procariotas corresponderia a 55 % a 86 % do total da biomassa de procariotas no planeta (13). Posteriormente, na sequência de análises de biomarcadores fosfolipídicos em quinze locais no mesmo oceano, a estimativa de abundância obtida anteriormente foi recalculada para 5×10^{30} células (14). Mais recentemente, uma estimativa feita por Kallmeyer et al. (15) aponta para um valor global de $2,9 \times 10^{29}$ células, com base em amostras de sedimentos do Oceano Pacífico. Uma explicação apresentada para a menor estimativa da abundância de total de procariotas em relação à de Whitman et al. (13) foi a inclusão, na amostragem, de zonas de giros oceânicos, onde a abundância registada é muito menor (15), como ilustrado na Figura 1.

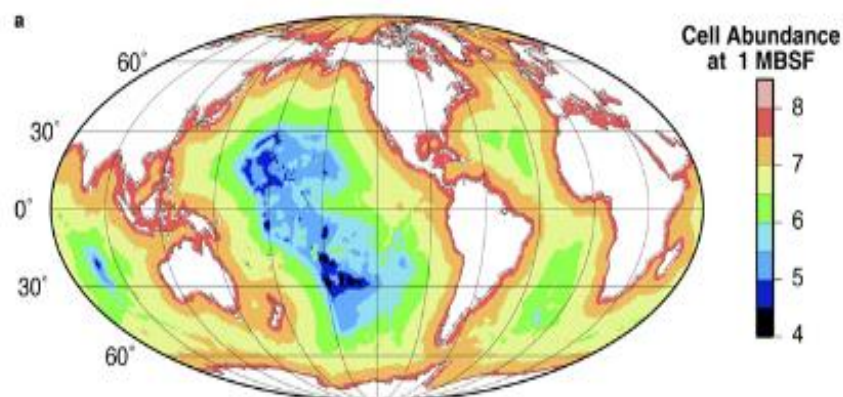


Figura 1. Adaptada de Kallmeyer et al. (15). Abundância total de procariotas por unidade de volume (cm^3) de sedimento, à profundidade de 1 mbsf, estimada com base em amostras do Oceano Pacífico.

Contrariamente ao que acontece nas zonas de fronteira entre as placas oceânicas e continentais, nas zonas dos giros oceânicos os valores da abundância de células são inferiores e decrescem muito mais rapidamente com a profundidade, como já tinha sido demonstrado por D'Hondt et al. (Figura 2). Este efeito pode estar relacionado com as baixas taxas de produção primária e de sedimentação (15). Deste modo, apesar das margens entre as placas oceânicas e continentais representarem apenas 7% da área dos oceanos, contribuem com 33% para a abundância total de procariotas, contrastando com os giros oceânicos que, representando uma área muito maior (42%), apenas contêm cerca de 10% das células existentes nos sedimentos marinhos (15).

Muitos estudos e investigações calcularam a abundância de procariotas ao longo de diferentes profundidades, em diversos ambientes. Em 1990, Parkes et al. (2), estimou uma abundância de bactérias na ordem dos $10^9 - 10^8 \text{ cel.cm}^{-3}$ ao longo de um perfil vertical de sedimentos SSP, numa zona interplacas (Peru) até aos 36 mafm. Em cálculos mais recentes de uma perfuração do programa *Ocean Drilling Program* (ODP) de uma zona interplacas no oceano Pacífico, a abundância foi calculada na ordem dos $10^8 - 10^6 \text{ cel.cm}^{-3}$ (16). Em sedimentos antárticos, a abundância bacteriana situou-se dentro da mesma gama de valores (17).

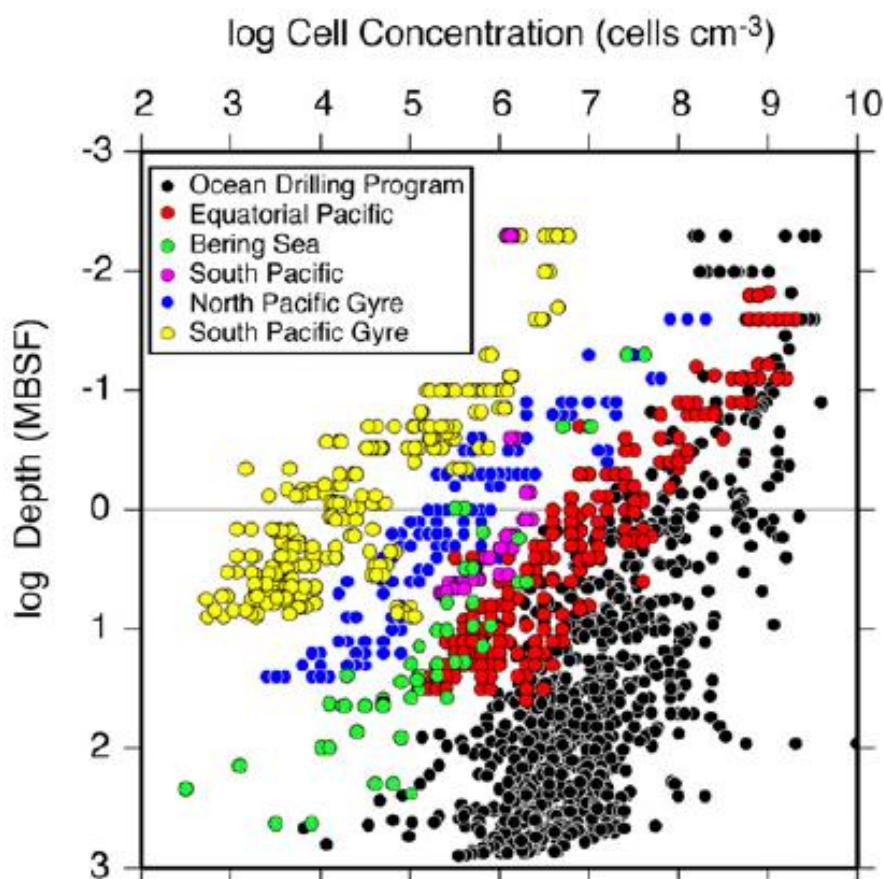


Figura 2. Adaptada de Kallmeyer et al. (15). Concentração de células vs profundidade (mbsf). A amarelo e a azul estão representadas as concentrações de células nos giros oceânicos do Pacífico Sul e Pacífico Norte, respetivamente (41).

Relativamente ao domínio *Archaea*, a média da abundância calculada por Biddle et al. (18) aproxima-se do valor obtido por Schippers et al. (16), estando geralmente menos representado, em termos de número de células, que o domínio *Bacteria* (Tabela 1). As estimativas da abundância total de procariotas são bastante próximas das estimativas da abundância de *Bacteria* (16), o que reforça a ideia de que este domínio é o mais representado em sedimentos SSP (19).

Recentemente, a deteção da presença de procariotas a cerca de 1900 mafm, no golfo de Canterbury (Nova Zelândia), permitiu estender o limite de profundidade até ao qual se conhecia a presença de microrganismos (20).

Para além dos procariotas, os fungos também fazem parte da biosfera subsuperficial marinha. Em 1997, Takami et al. (21) demonstraram a presença de fungos e leveduras em sedimentos provenientes da Fossa das Marianas, a

10,500 m de profundidade. Apesar da existência de muito menos informação relativamente à presença e atividade de fungos em sedimentos SSP do que relativamente a procariotas, foi recentemente demonstrada em laboratório por técnicas dependentes de cultivo, a sua capacidade para crescer e expressar atividade metabólica sob condições de pressão elevada (20 MPa) e baixa temperatura (5 °C) (22), o que explica a sua ocorrência em sedimentos SSP.

Tabela 1. Abundância de *Bacteria*, *Archaea* e procariotas totais em sedimentos subsuperficiais profundos de diferentes regiões geográficas.

	Local	Profundidade (maf)	Abundância (cel.cm ⁻³)	Referência
<i>Bacteria</i>	Sedimentos subsuperficiais (zona interplacas), Peru	1,5 até 36	$1,05 \times 10^9 - 1,99 \times 10^8$	(2)
	Sedimentos subsuperficiais, Sibéria*	1,5**	$4,7 \times 10^{8***}$	(23)
	Sedimentos subsuperficiais inferiores ao Ross Ice Shelf, Antárctida	0 até 1,5	de $1,7 \times 10^7$ cel.cm ⁻³ a $1,3 \times 10^6$	(17)
	Sedimentos subsuperficiais (zona interplacas), Pacífico Este	0 até 40	de 10^8 a 10^6	(16)
<i>Archaea</i>	Sedimentos subsuperficiais, Peru	0,7 até 10	média de $2,9 \times 10^6$	(18)
	Sedimentos subsuperficiais (zona interplacas), Pacífico Este	0 até 40	de 10^7 a 10^4	(16)
Total de Procariotas	Sedimentos subsuperficiais (zona interplacas), Pacífico Este	0 até 40	de 10^8 a 10^6	(16)
	Sedimentos subsuperficiais, Golfo de Canterbury	3,70 até 15,0 e 1911 até 1922	média de $1,5 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^4$	(20)

* Sedimentos continentais.

** Expresso em metros.

*** Expresso em cel.g⁻¹.

Nos sedimentos marinhos, a abundância de vírus supera cerca de 15 vezes a de *Bacteria* e *Archaea* e varia em conjunto com a abundância de ambos. No entanto, as suas reduzidas dimensões levam a que a biomassa de vírus seja apenas 5%

da biomassa total de microrganismos (24). Embora as estimativas da abundância de vírus sejam ainda alvo de discussão, estes são reconhecidos como entidades biológicas representadas em sedimentos SSP, atuando como reguladores da taxa de mortalidade e lise dos organismos procariotas, como um fator de evolução e contribuindo para a reciclagem e disponibilidade de elementos como o carbono ou o azoto com efeitos nos ciclos destes elementos à escala global (25–28). Deste modo, esta poderá ser uma das explicações para a existência de uma biomassa procariota relativamente elevada apesar das limitações nutricionais dos sedimentos SSP (29).

Assim como a abundância, a diversidade de procariotas em sedimentos SSP tem sido alvo de diversos estudos. Fry et al. (30) apresentou um resumo de informação sobre a estrutura das comunidades de *Bacteria* em sedimentos SSP (Figura 3), obtida em diferentes localizações e profundidades, com base na análise de bibliotecas genómicas de genes 16S rRNA. Os grupos mais abundantes e de distribuição mais ampla são *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexi* e a divisão *candidatus* JS1, possivelmente pertencente ao filo Atribacteria (31). enquanto as classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* apresentam uma menor abundância mas ainda distribuição alargada a todos os sedimentos (32).

Um estudo paralelo em sedimentos SSP a 2800 mafm, no Oceano Atlântico ao largo da costa do Brasil, revelou também a predominância do filo *Proteobacteria*, particularmente das classes *Betaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* (33). Na classe *Betaproteobacteria* as famílias *Comamonadaceae* e *Burkholderiaceae* foram as mais representadas, enquanto que na classe *Alphaproteobacteria* as famílias mais abundantes são as *Bazillariaceae*, *Phyllobacteriaceae* e *Methylobacteriaceae* (33). As *Deltaproteobacteria* representam apenas 7,3% do total de sequências obtidas neste local. No entanto, apesar de uma menor abundância, a esta classe está associado o género *Desulfovibrio*, importante na redução do sulfato.

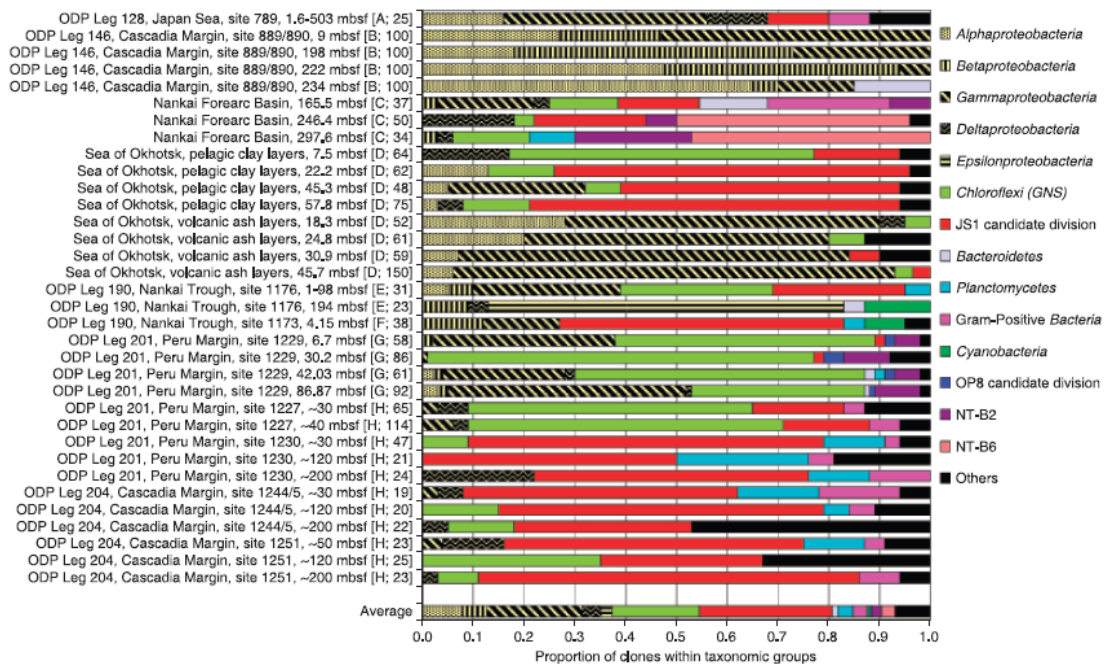


Figura 3. Adaptada de Fry et al. (30). Representação dos principais grupos taxonômicos do domínio *Bactéria* em bibliotecas genômicas de sequências de genes 16S rRNA, obtidas em sedimentos subperficiais profundos (0-503 mafm). Cada barra representa uma comunidade de um determinado local e profundidade em que os grupos taxonômicos estão representados por diferentes cores.

Em sedimentos SSP provenientes do Oceano Pacífico ao largo da costa do Peru, Parkes et al. (34) já tinha constatado que alguns taxa responsáveis pela redução do sulfato representam uma pequena proporção da população total de procariotas.

Recentemente, no golfo de Canterbury (Nova Zelândia), foi confirmada a elevada abundância de *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* e *Amatimonadetes*, indicando que estes taxa são relativamente ubíquos em sedimentos SSP (20). A divisão JS1 também foi documentada neste estudo.

A análise de comunidades de Archaea baseada em bibliotecas genômicas de genes 16S rRNA (Figura 4) revela uma elevada frequência do filo *Crenarchaeota* (73,4%), representado por 6 grupos. O filo *Euryarchaeota*, apesar de representado por uma maior diversidade de grupos, corresponde a uma menor abundância relativa (24,5%), sendo os *Euryarchaeota* termofílicos, o grupo mais representado.

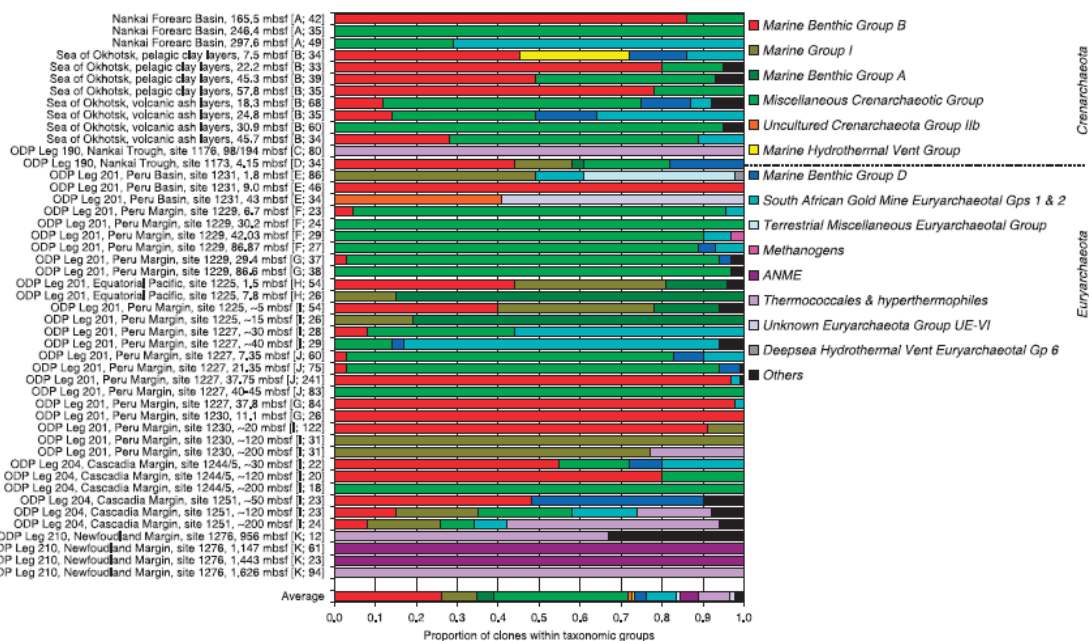


Figura 4. Adaptada de Fry et al. (30). Representação dos principais grupos taxonómicos do domínio *Archaea* em bibliotecas genómicas de sequências de genes 16S rRNA, obtidas em sedimentos subperficiais profundos (0-6956 mfm). Cada barra representa comunidade de um determinado local e profundidade em que os grupos taxonómicos estão representados por diferentes cores.

Recentemente, Polymenakou et al. (35) concluíram, através da análise de fragmentos de genes 16S rRNA obtidos a partir de sedimentos SSP do Mar Mediterrâneo, que o filo *Crenarchaeota* representa cerca de 11,4% dos grupos taxonómicos de procariotas e que o filo *Euryarchaeota* representa apenas cerca de 2,1% dos taxa.

1.2. Contribuição da biosfera profunda para os ciclos biogeoquímicos

Alguns grupos de procariotas provenientes de sedimentos SSP podem ser cultivados em laboratório (17,20,36). No entanto, mesmo as estirpes cultiváveis, apresentam crescimento lento em meios de cultura, provavelmente devido às diminutas exigências energéticas que caracterizam a sua atividade metabólica (7,8). De facto, microrganismos expostos a meios de cultura enriquecidos não apresentam um crescimento mais rápido do que em meios de cultura não enriquecidos (37). Pelo contrário, utilizando substratos com baixa disponibilidade de nutrientes, conseguem-se taxas de crescimento até quatro vezes superiores às que se registam em meios ricos (38). Ao contrário do que se verifica com os

microrganismos cultiváveis provenientes de sedimentos superficiais, os procariotas de sedimentos SSP apresentam muito baixa atividade metabólica. Tentativas de estimar o tempo de geração a partir de uma abordagem geoquímica, com base em taxas de consumo de oxigênio, redução de sulfato, consumo de matéria orgânica e liberação de dióxido de carbono apontaram inicialmente para valores da ordem dos séculos, substancialmente mais longos do que os resultantes de estimativas baseadas em ensaios de utilização de substratos orgânicos marcados radioativamente (39). Ainda assim, as evidências que existem sobre a biosfera de sedimentos SSP sustentam a hipótese de que esta se baseia na existência de células procariotas vivas, mortas ou num estado de dormência, desconhecendo-se em exatidão os seus mecanismos de crescimento e tempos de geração (40). Tanto o metabolismo aeróbio como o anaeróbio processam-se a um nível muito baixo, comparativamente com o apresentado pelos microrganismos da superfície dos oceanos (9,41,42). Estudos realizados a partir de sedimentos extraídos em expedições do IODP permitiram concluir que a taxa de respiração dos microrganismos destes sedimentos é muito mais lenta que a observada em microrganismos de sedimentos superficiais (7,9). Não se tem conhecimento, contudo, se todas as células apresentam a mesma taxa respiratória ou se existem pequenos grupos que a realizam muito mais intensamente (40).

No contexto dos ciclos biogeoquímicos do carbono e azoto, a atividade bacteriana afeta a biodisponibilidade destes elementos, as taxas de produção primária, a produção e consumo de gases com efeito de estufa, como o CO₂, CH₄ e N₂O, assim como a reposição de elementos chave, como o azoto ou o fósforo, provenientes da ação metabólica sobre os sedimentos (43,44). Os sedimentos SSP representam o maior e mais antigo depósito de carbono do planeta e o maior reservatório deste elemento, estimando-se que este equivalha a 50 vezes o carbono encontrado na atmosfera (45) e atinja, ao nível sedimentar, 15000 x 10¹⁸ g de carbono (46). Devido à acumulação de matéria orgânica nos sedimentos marinhos superficiais, esta encontra-se muito mais concentrada nesses sedimentos do que na água do oceano, apesar dos microrganismos neles presentes reciclarem e metabolizarem a matéria orgânica (5,45), já que esta é o

principal dador de eletrões para os processos quimiotróficos de obtenção de energia (47). No entanto, em regiões oligotróficas, o H_2 poderá desempenhar igualmente este papel (41).

Devido à ausência de luz e atividade fotossintética, o metabolismo heterotrófico é o mais importante a nível sedimentar (30). A oxidação da matéria orgânica, a produção de metano e outros hidrocarbonetos e a remoção do sulfato do oceano são alguns dos processos que ocorrem no fundo marinho devido à atividade de *Bacteria* e *Archaea* (47,48). No entanto, apenas uma pequena parcela das comunidades destes microrganismos terá porventura um papel relevante em ciclos biogeoquímicos, através da redução de sulfato ou da metanogénese (redução de dióxido de carbono) (30). Com o aumento da profundidade e diminuição da disponibilidade de oxigénio, os aceitadores de eletrões utilizados são o NO_3^- , o Mn^{4+} , o Fe^{3+} , o SO_4^{2-} e o CO_2 . Nas regiões situadas entre as margens oceânicas e continentais, as zonas de redução do O_2 e do NO_3^- são limitadas aos primeiros centímetros de sedimento, devido às elevadas taxas de oxidação. A zona de redução de Mn (IV) limita-se ao primeiro metro de profundidade e a redução do SO_4^{2-} às primeiras dezenas de metros (49–52). Esta sucessão de utilização de aceitadores de eletrões está relacionada com o potencial redox (E^0) das diversas espécies químicas. Deste modo, a redução do O_2 permite a obtenção de mais energia do que o NO_3^- por ter um E^0 mais elevado, assim sucessivamente (53). Foram descobertas variações a esta sucessão metabólica, nomeadamente numa expedição da ODP ao largo da costa peruana, no local 1231, em que se observou que a zona de redução do Mn (IV) se estendia até aos 60 mfm e não ocorria a redução do SO_4^{2-} ao longo de todo o perfil de sedimentos (54). Um outro tipo de variação foi documentado na mesma região, em que a interface mais comum (SO_4^{2-}/CH_4) é intercalada ao longo do perfil vertical de sedimentos pela interface oposta (CH_4/SO_4^{2-}) (47).

Como referido anteriormente, na ausência de oxigénio, o sulfato (SO_4^{2-}) é um aceitador de eletrões preferencial em sedimentos marinhos, sendo reduzido a sulfureto (H_2S) (55). No entanto, a redução intermédia de sulfato a sulfito caracteriza-se por um $E^0 = -516$ mV, um valor demasiado eletronegativo para que a reação possa envolver diretamente o NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

(dos microrganismos. Assim, o sulfato é previamente ativado pela ATP (*adenosine triphosphate*) sulfurilase, formando-se adenosina-fosfosulfatada (AFS) e pirofosfato, que é por sua vez hidrolisado pela pirofosfatase a 2-fosfato. O E° da AFS a sulfito é de -60 mV, o que permite a redução pelo NADH. O sulfito é depois reduzido a sulfureto, embora o E° da reação seja de -116 mV, não sendo ainda claro o mecanismo envolvido (56,57). A nível dos sedimentos SSP este processo metabólico foi observado, por exemplo, nas margens entre o Oceano Pacífico e o Peru a uma profundidade de 50 mafm, num perfil vertical de sedimentos dos 0 aos 479 mafm no mar do Japão e a profundidades entre 1900 e os 2900 mafm, no Mar Vermelho (34,58,59).

Em profundidades elevadas, na maioria dos sedimentos SSP, verifica-se um aumento da concentração de metano coincidente com o decréscimo da concentração de sulfato, que corresponde também a uma transição de vias de obtenção de energia prevaletentes nas comunidades de procariotas (34). Normalmente ocorre nesta zona, uma competição entre procariotas sulfato-redutores e metanogénicos por nutrientes limitantes (55), embora possa ocorrer metanogénese em zonas onde o sulfato está ainda disponível (34). A profundidade a que esta transição ocorre é variável. Numa expedição do ODP (local 1227) na costa peruana, recolheram-se sedimentos da zona de transição sulfato-metano a profundidades entre os 35 a 41 mafm, enquanto numa outra expedição essa transição foi registada a 9 mafm (60).

A produção de metano (CH_4) é realizada por *Archaea* sob a forma das vias de redução do CO_2 ou do CH_3COOH (ácido acético) que funcionam como aceitadores finais de eletrões (61). Apesar de em sedimentos profundos este gás se encontrar sob a forma de reservatórios, em sedimentos SSP recolhidos numa expedição do OPD ao largo da ilha de Honshū (Leg 190), no Japão, a produção de metano foi confirmada a 100 e 200 mafm, assim como ao largo da costa do Peru, a profundidades entre os 50 e os 100 mafm (47,62). O metano é um gás com um efeito de estufa bastante mais acentuado que o do dióxido de carbono e a sua concentração atmosférica pode ter influência no clima do planeta, com impacto direto no aquecimento global (63).

1.3. Justificação do trabalho e objetivos

A perceção e o conhecimento da diversidade e abundância dos procariotas são os pontos-chave para se perceber globalmente de que forma estes organismos participam nos ecossistemas SSP. No entanto, a informação sobre as propriedades ou fatores que influenciam a sua distribuição, abundância e diversidade é ainda escassa. Por sua vez, a influência dos processos metabólicos mediados por estes microrganismos sobre os ciclos biogeoquímicos do carbono e do enxofre está ainda largamente inexplicada. Qual será de facto o impacto da redução do sulfato e da metanogénese em sedimentos SSP sobre a degradação da matéria orgânica ou sobre o efeito de estufa na atmosfera?

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão dos principais fatores de regulação da distribuição de procariotas em sedimentos marinhos subsuperficiais profundos, através da análise de perfis verticais de abundância e diversidade estrutural e do estabelecimento de relações com o ambiente físico-químico prevalecente e as características das comunidades de procariotas em diferentes níveis de profundidade de sedimentos SSP.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem, preparação e caracterização físico-química das amostras

A amostragem e preparação do sedimento para preservação foi feita pela equipa *International Ocean Discovery Program* (IODP), na expedição 351 – *Izu Bonin Mariana Arc Origins*, a bordo do navio *JOIDES Resolution*, entre 8 e 30 de Junho de 2014, no local U1438 correspondente a uma profundidade de 4700 m, na bacia sedimentar Anami-Sankaku, adjacente à crista Kyushu-Palau que corresponde ao antigo arco vulcânico da zona de subducção intra-oceânica Izu-Bonin-Mariana (64). Perfurou-se uma sequência sedimentar de 1400 m e recolheu-se 25 amostras de sedimento subsuperficial ao longo do perfil vertical, entre as profundidades de 0 e 879 mfm. Para as análises microbiológicas, com uma mini-carote esterilizada, recolheu-se 30 cm³ de sedimento de cada profundidade. Devido à extrema litificação e compactação, as amostras B23X3, D24R1, D40R5, D64R1 e E5R2 foram recolhidas de forma diferente. Retirou-se uma secção de 10 cm de espessura, de uma carote de maiores dimensões utilizada na colheita, que foi partida e triturada, com recurso a ferramentas esterilizadas, de onde se recolheu amostras de 30 cm³.

Foi realizada uma análise físico-química com base no cálculo das concentrações de diversos compostos químicos. A identificação das amostras, assim como a profundidade a que foram recolhidas, caracterização físico-química, percentagem de peso seco e peso húmido, é apresentada no Anexo 1.

As amostras de 30 cm³ foram subdivididas em porções de 20 cm³ e 10 cm³, destinadas às análises por *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e à determinação da abundância total de procariotas, respetivamente. A listagem de amostras utilizadas em cada análise é apresentada no Anexo 2.

As sub-amostras destinadas à análise por DGGE foram armazenadas a -80 °C em tubos de Falcon esterilizados.

As sub-amostras destinadas à determinação da abundância total de procariotas foram divididas em 10 alíquotas de 1 g e fixadas. Ressuspendeu-se cada alíquota

em 3 mL de D17 (NaCl (17 g L^{-1})), esterilizado por filtração e autoclavado, adicionado de 2% formaldeído. Homogeneizou-se a mistura no vórtex e conservou-se à temperatura ambiente durante 4 horas. Centrifugou-se durante 2 min a 2600 rpm, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 3 mL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 contendo $1,44 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $30 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$. Agitou-se no vórtex durante 2 min, repetiu-se os dois passos anteriores e finalmente descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 3 mL de uma mistura 1:1 de tampão fosfato salino (PBS, contendo $1,44 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $30 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) e etanol 80%, ressuspendeu-se com agitação no vórtex durante 2 min e armazenou-se a -80°C .

2.2. Análise da comunidade de *Bacteria* com base no DNA

2.2.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o *FastDNA® Spin Kit for Soil* (MP Biomedicals) para alíquotas de sedimento de 0,5 - 0,7 g (Anexo 3). Todos os reagentes utilizados faziam parte do *kit* de extração.

O sedimento foi transferido para microtubos contendo 500 μL de *Lysing Matrix*, adicionou-se 122 μL de MT Buffer e 978 μL de *Sodium Phosphate Buffer* a cada tubo e homogeneizou-se o conteúdo de cada um no *FastPrep® Instrument* durante 40 seg a uma velocidade de $6,0 \text{ m.s}^{-1}$. Por fim, procedeu-se a uma centrifugação (*ScanSpeed 1524 Labogene*) a 16000 rpm, durante 15 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo e adicionou-se 250 μL de *Protein Precipitation Solution* (PPS). A mistura foi centrifugada a 16000 rpm durante 5 min, para permitir a deposição proteica. O sobrenadante foi recolhido num novo microtubo ao qual se adicionou 1,0 mL de *Binding Matrix*. Agitou-se durante 2 min para homogeneizar a mistura e deixou-se em repouso durante 3 min para permitir a ligação do DNA à matriz de sílica. Retirou-se 500 μL do sobrenadante sem interferir com a matriz depositada e ressuspendeu-se esta última no sobrenadante remanescente. Transferiu-se 600 μL da mistura obtida para um *Spin™ Filter*, contendo um tubo de colheita acoplado, e centrifugou-se a

16000 rpm durante 1 min. Rejeitou-se o líquido do tubo de colheita, adicionou-se a restante mistura ao *Spin*TM *Filter* e centrifugou-se novamente, rejeitando-se o líquido. Adicionou-se ao *pellet* 500 µL de *SEWS-M* e ressuspendeu-se o mesmo. Centrifugou-se a 16000 rpm, durante 1 min e esvaziou-se de novo o tubo de colheita. Centrifugou-se de novo o *Spin*TM *Filter*, sem adição de qualquer solução, a 16000 rpm durante 2 min, de modo a retirar a solução residual. Descartou-se o tubo de colheita e colocou-se um novo. Por fim, secou-se o *Spin*TM *Filter* durante 5 min à temperatura ambiente e adicionou-se 40 µL de *DNase/Pyrogen-Free Water* (DES) à matriz. Incubou-se durante 5 min, a 55 °C, centrifugou-se a 16000 rpm durante 1 min, para permitir a passagem do DNA eluído para o novo tubo de colheita. Descartou-se o *Spin*TM *Filter* e armazenou-se as amostras de DNA a -20 °C.

2.2.2. Amplificação por *Nested PCR*

A metodologia de amplificação utilizada nas duas reações de PCR, que constituem o *Nested PCR*, foi baseada no procedimento proposto por Boon et al. (65) e conduzida no *Professional TRIO Thermocycler* (Biometra). Nesta abordagem, os fragmentos amplificados na primeira ronda, são amplificados de novo, numa segunda reação de PCR. Para a amplificação das regiões da subunidade 16S rRNA de *Bacteria*, utilizaram-se os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') *forward* e 1494R (5'-GCTCTAGAGCTGACTGACTGAGGYTACCTTGTTACGACTT-3') *reverse*, respetivamente, para a primeira ronda de PCR e os primers 984F-GC (5'-GC-clamp-AACGCGGAAGAACCTTAC-3') *forward* e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') *reverse*, respetivamente, para a segunda ronda de PCR. As condições de amplificação em cada uma das rondas de PCR encontram-se resumidas na Tabela 2.

Para a primeira ronda de PCR a mistura de reação (25 µL) foi preparada com 1 µL de produto de extração, 10 µL de água (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), 12,5 µL de *DreamTaq PCR Master Mix* (2x) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), 1 µL de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (2,0 mg/mL) e 0,25 µL de cada

um dos primers 27F (0,1 mM) e 1494R (0,1 mM). Para a segunda ronda de PCR, a mistura de reação foi preparada com 3 µL de produto da primeira reação de amplificação, 6,5 µL de água (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), 12,5 µL de *DreamTaq PCR Master Mix* (2x) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), 2 µL de acetamida 4% (vol/vol) e 0,5 µL de cada um dos primers 984GC-F (0,1 mM) e 1378R (0,1 mM).

Antes de cada série de ciclos, a temperatura foi elevada até 94 °C durante 5 min para a primeira ronda e durante 4 min para a segunda ronda de PCR, e no final de cada série a temperatura foi mantida a 72 °C durante 10 min, para ambas as rondas, de modo a promover a elongação final (65).

Incluiu-se um controlo negativo (água destilada e esterilizada) em cada uma das rondas de amplificação PCR, de modo a verificar a existência de contaminações.

Para avaliar o sucesso da amplificação, procedeu-se à análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose (1.7% [w/v]), contendo *GelRed* (Biotium Inc.), incluindo o marcador *Gene Ruler* 1Kb (Thermo Fisher Scientific) (0,1 µg/µL), comparando-se o tamanho das bandas resultantes dos produtos de amplificação com o tamanho das bandas do marcador.

Tabela 2. Primers e parâmetros das reações de amplificação por *Nested PCR*. Antes de cada série de ciclos, a temperatura foi inicialmente elevada até 94 °C durante 5 min, para a primeira ronda e durante 4 min, para a segunda ronda de PCR e no final de cada série a temperatura foi estabelecida em 72 °C durante 10 min, para ambas as rondas, de modo a promover a elongação final (65).

Alvo	“Primers”	Condições do PCR								Ref.
		Número de ciclos	Desnaturação		“Annealing”		Elongação			
			°C	min	°C	min	°C	min		
1ª										
Ronda de PCR										
Bacteria	27F, 1494R	30	94	0,75	56	0,75	72	1,5	(66)(67)	
2ª										
Ronda de PCR										
Bacteria	984F-GC ^a , 1378R	30	95	1	53	1	72	1,5	(68)(69)	

^a Foi adicionada uma “GC clamp” (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') à extremidade 5' do primer 984F-GC, de modo a evitar que haja uma total desnaturação dos fragmentos durante a desnaturação (68).

2.2.3. Análise por *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE)

Os produtos de amplificação foram analisados por *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), segundo Muyzer et al. (70) num *DCcode Vertical Electrophoresis Apparatus* (Bio-Rad). As amostras (3,5 µL de amostra e 5 µL de tampão de carga) foram colocadas num gel de poliacrilamida contendo 6-10% de acrilamida (Rotiphorese[®]) e um gradiente linear de ureia e formamida (Rotiphorese[®]) de 40% a 58%. Na corrida foi utilizado o tampão TAE (0,5 M Tris-Base, Sigma; 0,05 M EDTA, Sigma; 0,1 M CH₃CO₂Na, Sigma; pH 8,0) e uma voltagem de 80 V, aplicada durante 16 horas. Após a corrida, o gel foi fixado com uma mistura soluções de etanol a 10% (vol/vol) e ácido acético a 0,5%, corado com uma solução de nitrato de prata 0,1% (wt/vol), revelado com uma solução de hidróxido de sódio (9%), e finalizado com uma solução de carbonato de sódio 0,75% (wt/vol) (71).

Os géis foram digitalizados com recurso a um equipamento Molecular Imager chemiDoc XRS + digitalize system (Bio-Rad) e analisados com o software *BioNumerics* (versão 6.6) (Applied Maths) tendo em conta a posição e a intensidade das bandas. Os dados foram sujeitos a uma transformação $\log_{10} (x + 1)$, dando origem a uma matriz de abundâncias relativas que serviu de base de cálculo de uma matriz de (de)similaridade através do coeficiente de Bray-Curtis, usando a função `vegdist()` (inserida no pacote `vegan`) (72), e do índice de diversidade de Shannon-Weaver, usando a função `as.matrix(diversity())` (73) do R (versão 3.2.2; <https://www.r-project.org/>, de 14 de Agosto de 2015) com recurso ao RStudio (versão 0.99.484; <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>, de 8 de Setembro de 2015).

Logaritmizou-se as variáveis H' (Índice de Shannon-Weaver) e profundidade e avaliou-se a relação entre ambas, assumindo-se a primeira como a variável dependente e a segunda como a variável independente. Para a elaboração dos gráficos de dispersão utilizou-se o software SigmaPlot (Exact Graphs and Data Analysis, Systat Software, Inc).

2.3. Determinação da abundância total de procariotas

A abundância de procariotas foi determinada nas amostras referidas no Anexo 2, pela técnica de microscopia de epifluorescência, utilizando laranja de acridina como fluorocromo (74). Para facilitar a observação, as amostras foram previamente sujeitas a um tratamento mecânico para separação das células aderentes e remoção dos detritos.

2.3.1. Extração das células

De cada amostra, foram transferidas 3 alíquotas (réplicas) de 100 μL de suspensão de sedimento para microtubos esterilizados, aos quais se adicionou 500 μL de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) contendo 1,44 g L^{-1} Na_2HPO_4 , 0,2 g L^{-1} KCl , 0,24 g L^{-1} KH_2PO_4 , 30 g L^{-1} NaCl . Sonificou-se (SilverCrest®) as suspensões durante dois períodos de 1,5 min, com um intervalo de 30 seg entre

eles, para destacar as células aderentes a partículas. Centrifugou-se a suspensão a 7100 rpm durante 2 min (Heraeus Pico 17 Centrifuge (Thermo Scientific)) para sedimentação dos detritos. O sobrenadante foi recolhido em microtubos esterilizados e utilizado imediatamente.

2.3.2. Recolha e coloração das células

As células foram recolhidas por filtração sobre membranas negras de polycarbonato (Poretics) com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,2 μm . As membranas foram humedecidas em água destilada filtrada e esterilizada e colocadas nos poços da rampa de filtração (Millipore), sobre pré-filtros de nitrato de celulose (Sartorius) de porosidade 0,45 μm , com 25 mm de diâmetro. Em cada poço colocou-se 1 mL de água destilada filtrada e esterilizada, para facilitar a distribuição homogênea da amostra e adicionou-se 500 μL da suspensão de células resultante do procedimento de extração. As suspensões foram filtradas sob pressão negativa (< 200 mm Hg) ligando o sistema a uma bomba de vácuo. Sobre a superfície da membrana, aplicou-se uma solução de laranja de acridina (0,03%). Protegeu-se o sistema da luz com folha de alumínio e deixou-se corar durante 5 min. Ligou-se novamente o vácuo para remover o corante e lavou-se com 3 aplicações de 2 mL de água destilada filtrada e esterilizada. As membranas foram retiradas do sistema de filtração e montadas entre lâmina e lamela usando óleo de imersão de baixa fluorescência (Cargille) como meio de montagem. As preparações foram conservadas a -20 °C até à sua observação. Como controle positivo inclui-se uma amostra de sedimento da Ria de Aveiro com uma concentração conhecida de células (75). Como controle negativo usou-se água destilada filtrada e esterilizada.

2.3.3. Quantificação de procariotas por microscopia de epifluorescência

O teor de células foi determinado por contagem direta num microscópio de epifluorescência (Leica DMLS) equipado com lâmpada de mercúrio e filtro

Chroma 31011 para laranja de acridina. Procedeu-se à contagem de células livres e aderentes num mínimo de 30 campos óticos ou 300 células contadas. A estimativa do número total de células por campo foi obtida pela soma do número de células livres com o dobro do número de células aderentes a partículas (76). Utilizou-se a Equação 1 para se calcular a concentração total de procariotas por grama de peso fresco, em que média de células por campo foi corrigida para a área do campo ótico, área da membrana, volume da alíquota e concentração de sedimento na suspensão fixada. Os resultados foram expressos em número de células por unidade de peso seco de sedimento (células.gps⁻¹). Através do rácio de peso seco/peso fresco calculou-se a concentração total de procariotas por grama de peso seco e o respetivo desvio padrão.

Logaritmizou-se as variáveis correspondentes à concentração total de células de procariotas e à profundidade e avaliou-se a relação entre ambas, assumindo-se a primeira como a variável dependente e a segunda como a variável independente. Utilizou-se o software *SigmaPlot* (Exact Graphs and Data Analysis, Systat Software, Inc) para a elaboração dos gráficos de dispersão.

$$[P] = \frac{(NMP \text{ campo} \times F)}{(m \times f)}$$

Equação 1. Concentração total de procariotas por grama de peso fresco ([P]), em que NMP é o número médio de procariotas por campo, *F* a razão entre a área útil da membrana e a área do campo de contagem, *m* a quantidade de sedimento presente em 100 µL de amostra e *f* o fator de diluição.

2.4. Análise de variação vertical

Logaritmizou-se as variáveis concentração de sulfato e concentração de bário na água intersticial e avaliou-se a variação destas com o log da profundidade, assumindo-se as primeiras como as variáveis dependentes e a segunda como a variável independente. Utilizou-se o software *SigmaPlot* (Exact Graphs and Data Analysis, Systat Software, Inc) para a elaboração dos gráficos de dispersão.

2.5. Análise estatística

A ordenação de componentes principais (PCO) do perfil DGGE de *Bacteria* foi feita com recurso à função `plot.pco()` (inserida no pacote `vegan`) (72) do R (versão 3.2.2; <https://www.r-project.org/>, de 14 de Agosto de 2015) e com recurso ao RStudio (versão 0.99.484; <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>, de 8 de Setembro de 2015).

Procedeu-se a duas outras ordenações PCO dos perfis DGGE de modo a cruzar-se os dados das comunidades de *Bacteria* com os parâmetros físico-químicos. As amostras que foram utilizadas nesta ordenação encontram-se identificadas no Anexo 2. Calculou-se a significância relacionada com o grau de coerência da correlação entre os parâmetros físico-químicos e as comunidades de *Bacteria* usando a função `ord.fit <- envfit()` (inserida no pacote `vegan`) (72) do R (versão 3.2.2; <https://www.r-project.org/>, de 14 de Agosto de 2015) e com recurso ao RStudio (versão 0.99.484; <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>, de 8 de Setembro de 2015). Ilustrou-se a vectorização dos parâmetros físico-químicos através da mesma função e cruzou-se esses vetores com as ordenações PCO obtidas.

Utilizou-se a correlação de Spearman através do *software* IBM SPSS Statistics 23 para calcular correlações entre as variáveis normalizadas: índice de diversidade Shannon-Weaver, profundidade, concentração de células e conjunto de todos os parâmetros físico-químicos.

3. Resultados

3.1. Diversidade estrutural de comunidades de *Bacteria*

A diversidade estrutural das comunidades de *Bacteria* estabelecidas ao longo do perfil vertical de sedimentos foi avaliada por DGGE de fragmentos de genes 16S rRNA, tendo em consideração o número e a posição das bandas (Figura 5). Os perfis são caracterizados por um número relativamente elevado de bandas ($\approx 1-10$). A vermelho estão assinaladas as bandas observadas apenas nos sedimentos mais superficiais (<67 mafm) e a amarelo estão representadas as bandas características dos sedimentos mais profundos (>880 mafm).

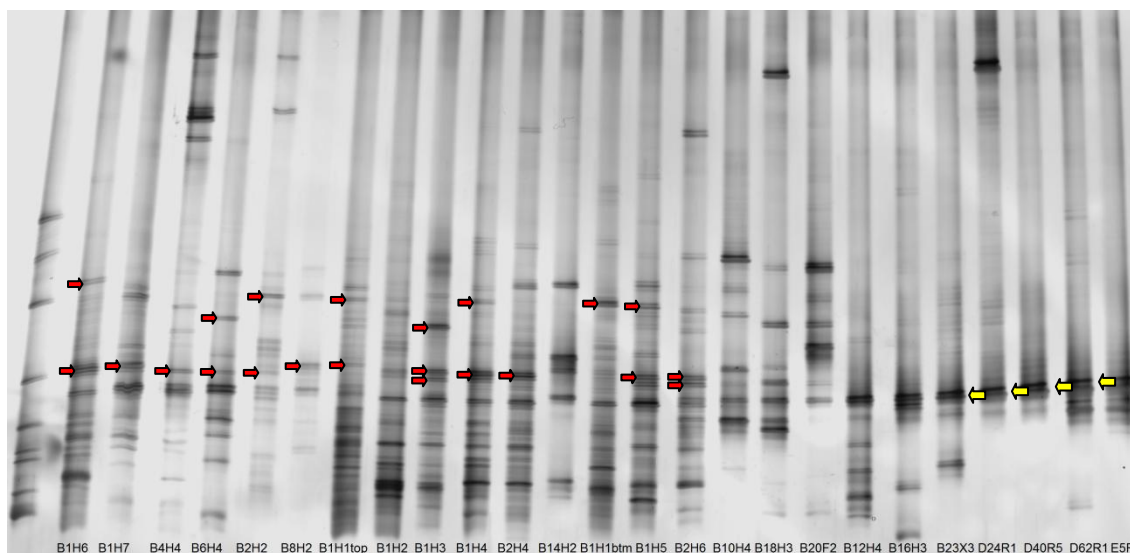


Figura 5. Perfis de DGGE de fragmentos de genes de rRNA 16S de *Bacteria* amplificados a partir de DNA extraído das amostras de sedimentos. A vermelho estão assinaladas as bandas observadas apenas nos sedimentos mais superficiais (<67 mafm) e a amarelo estão representadas as bandas características dos sedimentos mais profundos (>879 mafm).

A ordenação dos perfis DGGE por PCO (Figura 6) indica a existência de comunidades estruturalmente distintas nas amostras obtidas a diferentes gamas de profundidade ao longo da coluna de sedimento. As amostras foram agrupadas por cores de acordo com as unidades litológicas em que se inseriam. Em geral, as amostras mais superficiais, correspondentes a sedimentos de profundidades <140 mafm, aparecem agrupadas na região à esquerda da origem do eixo das abcissas enquanto as amostras de sedimentos mais profundos (420 a 880 mafm)

apresentam-se reunidas num *cluster* oposto, deslocado para a região positiva do eixo. As amostras correspondentes às profundidades intermédias (140 a 190 mafm) ocorrem numa região intermédia do gráfico, sobrepondo-se com ambos os grupos referidos anteriormente.



Figura 6. PCO relativo à ordenação das amostras de acordo com os seus perfis DGGE. A castanho claro estão representadas as amostras superficiais (< 140 mafm), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.

Relativamente ao subconjunto de amostras para os quais estavam disponíveis dados de caracterização físico-química e relativamente aos mesmos que foram analisados em todas as amostras, procedeu-se à análise de ordenação por PCO, cruzando-a com a vectorização dos parâmetros alcalinidade, azoto (N_2), boro, bário, cálcio, potássio, magnésio, sódio e o ião sulfato, por serem os que apresentaram significância estatística ($p \leq 0,1$) em correlação com a ordenação das amostras com base nos perfis DGGE, ou seja, cujas variações nas amostras foram semelhantes à variação dos *clusters* formados no PCO (Figura 6). O resultado está representado na Figura 7. Os vetores alcalinidade, azoto, boro, magnésio, sódio, potássio e sulfato, relacionam-se com o *cluster* de amostras mais superficiais, enquanto os vetores bário e cálcio se relacionam com o *cluster* das amostras mais profundas.

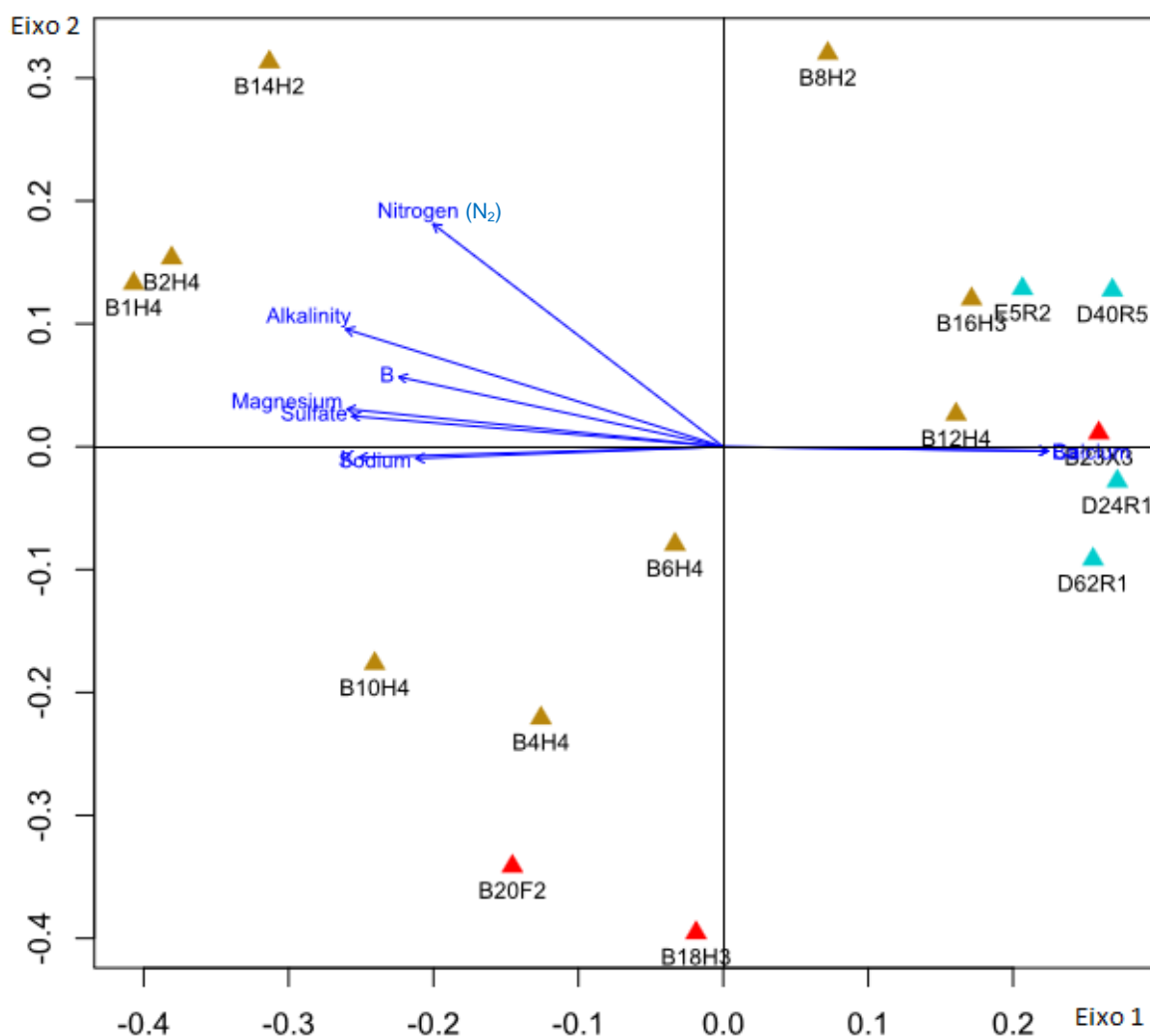


Figura 7. PCO relativo à ordenação de um subconjunto de amostras de acordo com os parâmetros físico-químicos com representação dos vetores relativos aos parâmetros que apresentaram significância estatística ($p \leq 0,1$) em correlação com a ordenação das amostras: alcalinidade, azoto, boro, bário, cálcio, potássio, magnésio, sódio e sulfato. A castanho claro estão representadas as amostras superficiais (< 140 mafm), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mafm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mafm.

O índice de Shannon-Weaver (H') foi utilizado para se estimar a diversidade de *Bacteria* (Tabela 3). A relação entre o log do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') e o log da profundidade (mafm) foi avaliada a partir dos dados de DGGE (Figura 8) apenas nas amostras para os quais estava disponível a caracterização físico-química. O valor de H' mais elevado (3,04) foi registado na amostra B1H4 (2,9 mafm) e o valor mais baixo (1,05) foi observado numa das amostras mais profundas D40R5 (423,7 mafm). A média de H' foi 2,40 nos sedimentos < 150 mafm, 2,32 nos sedimentos entre os 150 – 190 mafm e 1,58

entre os 190 – 880 mafm. O perfil de variação vertical caracteriza-se de uma forma geral, pelo decréscimo do valor de H' com o aumento da profundidade. No entanto, verificou-se uma inversão deste padrão entre as profundidades 89 e 792 mafm, a que correspondem as amostras B10H4, B18H3 e D62R1, nas quais se verificaram índices de diversidade mais elevados.

Tabela 3. Valores do índice de Shannon-Weaver (H') para cada amostra.

Amostras	H'
B1H4	3,04
B2H4	3,03
B4H4	2,71
B6H4	2,39
B8H2	1,60
B10H4	2,48
B12H4	2,36
B14H2	2,01
B16H3	1,97
B18H3	2,52
B20F2	2,50
B23X3	1,93
D24R1	1,76
D40R5	1,05
D62R1	2,04
E5R2	1,45

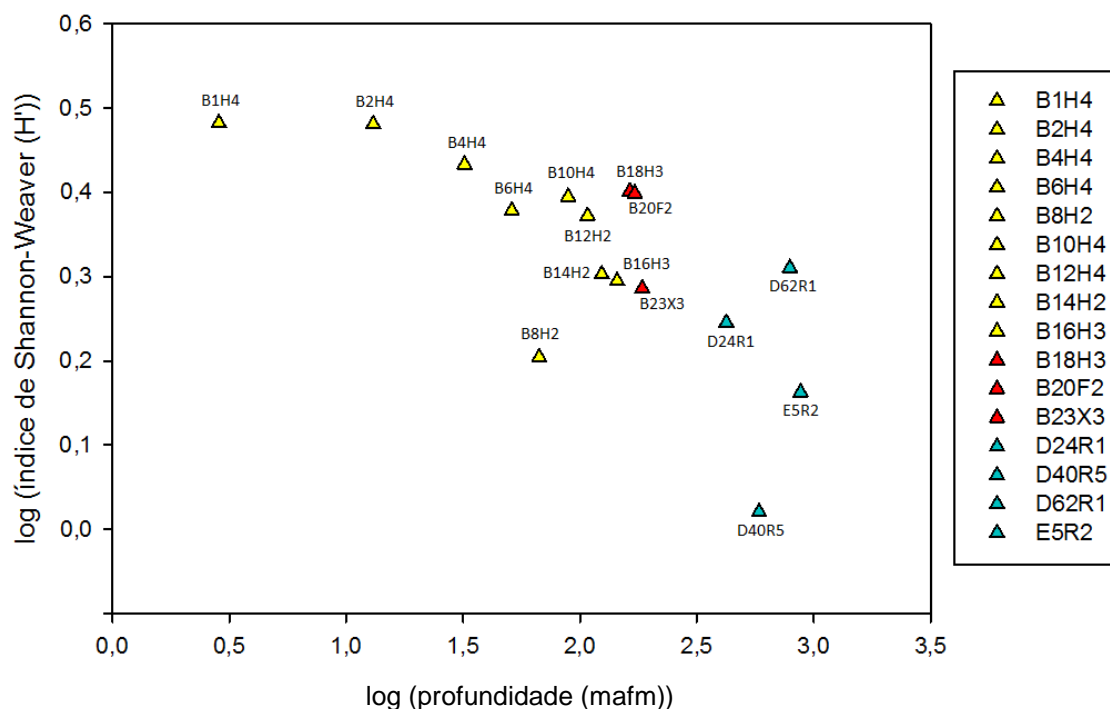


Figura 8. Variação do log do índice de Diversidade de Shannon-Weaver (H') em função do log da profundidade (mfm) das amostras de sedimento. A amarelo estão representadas as amostras superficiais (< 140 mfm), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 mfm e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 mfm.

3.2. Abundância de procariotas

A abundância total de procariotas foi determinada apenas nas amostras para as quais estava disponível a caracterização físico-química (Tabela 4). A Figura 9 representa a variação do log da concentração de células em função do log da profundidade das amostras. A concentração mais elevada ($8,66 \times 10^6$ células.gps⁻¹) foi registada na amostra B8H2 (67 mfm) e o valor mais baixo ($2,26 \times 10^6$ células.gps⁻¹) foi observado na amostra mais profunda E5R2 (879 mfm). O perfil de variação vertical caracteriza-se de uma forma geral, pelo decréscimo da concentração de células com o aumento da profundidade. No entanto, verificou-se uma inversão deste padrão entre as profundidades 51 e 171 mfm, a que correspondem as amostras B6H4, B8H2, B16H3 e B20F2, nas quais se verificaram concentrações de células relativamente elevadas.

Tabela 4. Concentração de células para cada amostra.

Amostras	Concentração (células.gps ⁻¹) (x10 ⁶)	Desvio Padrão (x10 ⁶)
B1H4	5,30	1,40
B2H4	4,74	5,97*
B4H4	4,38	1,15*
B6H4	7,33	5,30
B8H2	8,66	2,88
B10H4	5,15	9,93*
B12H4	3,76	4,55*
B14H2	3,66	8,69*
B16H3	6,39	6,80*
B18H3	4,04	1,06
B20F2	5,64	1,77
B23X3	4,51	1,88
D24R1	4,18	1,47
D40R5	3,30	6,71*
D62R1	2,72	1,76*
E5R2	2,26	4,29*
Controle Negativo	5,76*	0

* (x10⁵)

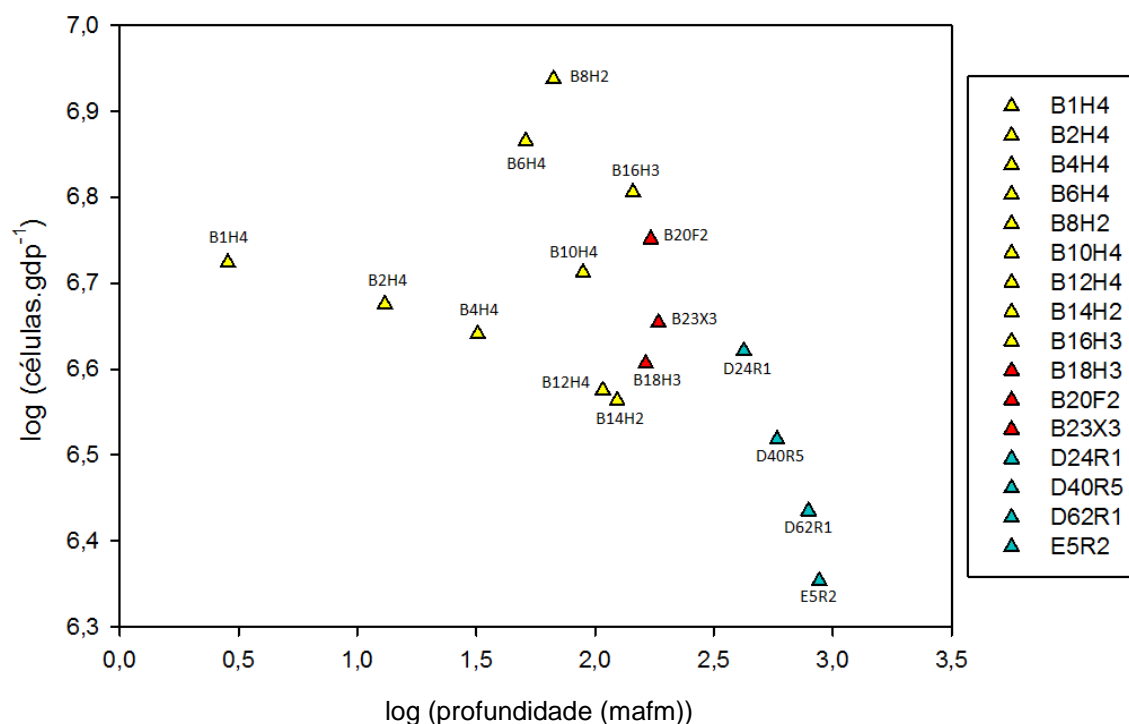


Figura 9. Variação log da concentração de células (células.gps⁻¹) em função do log da profundidade (maf) das amostras de sedimento. A amarelo estão representadas as amostras superficiais (< 140 maf), a vermelho as amostras correspondentes a profundidades de 140 a 190 maf e a azul claro as amostras correspondentes a profundidades de 420 aos 880 maf.

3.3. Perfis verticais

As variações da abundância total de procariotas, índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), concentração de sulfato e concentração de bário com a profundidade estão ilustradas na figura 10. Verificou-se uma diminuição das três primeiras variáveis com o aumento da profundidade, embora a concentração de sulfato tenha apresentado uma diminuição mais regular do que o H' e a concentração de células. Pelo contrário, verificou-se um aumento abrupto da concentração de bário com a profundidade. No geral, para sedimentos de profundidade superiores as três primeiras variáveis apresentaram valores menores em relação a sedimentos de profundidades inferiores, tendo-se denotado o oposto em relação à concentração de bário. É notória uma zona de descontinuidade, nas quatro variáveis, entre os valores 1,5 e 2,5 do eixo da profundidade.

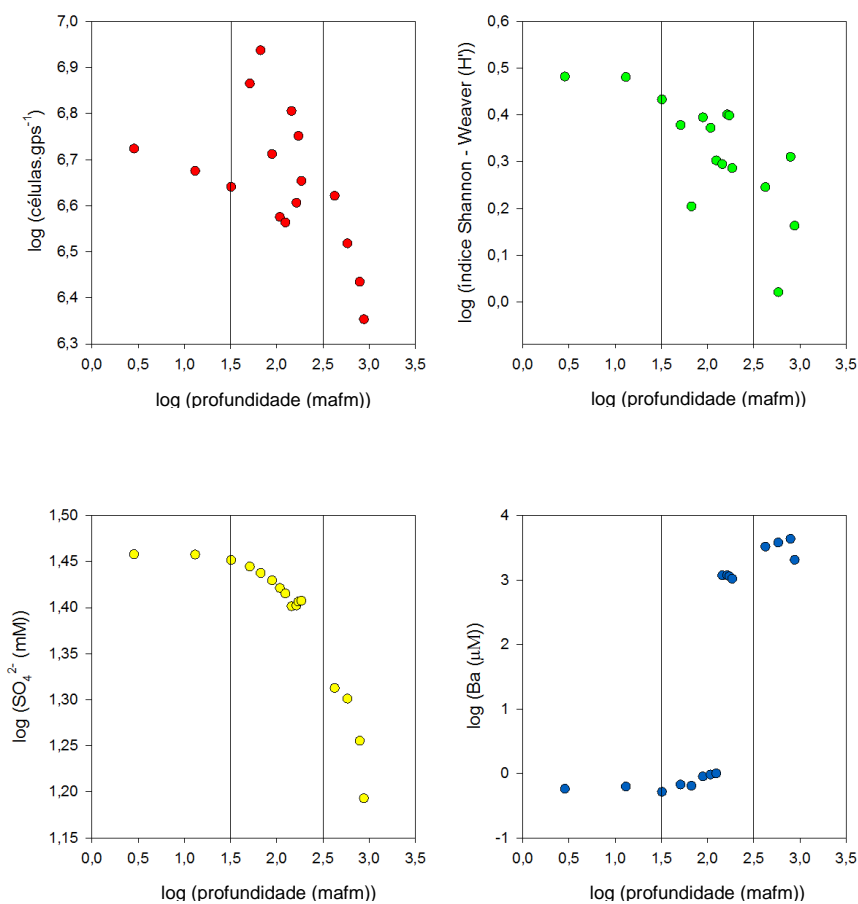


Figura 10. Variação entre variáveis logaritmizadas abundância total de procariotas, índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), concentração de sulfato e concentração de bário em função do log da profundidade. Nos eixos das abcissas está representada a profundidade (mafm) e nos eixos das ordenadas estão representadas a abundância total de procariotas (células.gps⁻¹) a vermelho, o índice de diversidade de *Bacteria* (H') a verde, a concentração de sulfato (mM) a amarelo e a concentração de bário (μM) a azul.

3.4. Análise de correlação

As correlações de Spearman calculadas entre a profundidade, índice de diversidade H' , concentração de células e conjunto dos parâmetros físico-químicos bário, magnésio, potássio, sulfato, sódio, azoto e alcalinidade foram as únicas a apresentar significância estatística ($p \leq 0,05$). As correlações entre estas variáveis estão representadas na Tabela 5, em conjunto com o grau de significância e R^2 de cada uma.

Tabela 5. Tabela representativa da Correlação de Spearman entre as variáveis: profundidade, concentração de células, índice de Shannon-Weaver (H') e parâmetros físico-químicos Ba, Mg, K, SO₄²⁻, Na, N e alcalinidade.

		Profundidade	Células.gps ⁻¹	H'	Ba	K	Mg	SO ₄ ²⁻	Alcalinidade	N	Na
Profundidade	Coeficiente correlação	-									
	Significância										
	R ²										
Células.gps ⁻¹	Coeficiente correlação	-0,621*	-								
	Significância	0,010									
	R ²	0,418									
H'	Coeficiente correlação	-0,688**	0,300	-							
	Significância	0,003	0,259								
	R ²	0,4307	0,030								
Ba	Coeficiente correlação	0,944**	-0,579*	0,606*	-						
	Significância	0,000	0,019	0,013							
	R ²	0,728	0,275	0,367							
K	Coeficiente correlação	-0,671**	0,621*	0,465	-0,712**	-					
	Significância	0,004	0,010	0,070	0,002						
	R ²	0,560	0,367	0,191	0,523						
Mg	Coeficiente correlação	-0,976**	0,576*	0,712**	-0,953**	0,644**	-				
	Significância	0,000	0,019	0,002	0,000	0,007					
	R ²	0,880	0,351	0,525	0,880	0,560					
SO ₄ ²⁻	Coeficiente correlação	-0,971**	0,597*	0,676**	-0,968**	0,709**	0,947**	-			
	Significância	0,000	0,015	0,004	0,000	0,002	0,000				
	R ²	0,973	0,405	0,490	0,743	0,563	0,923				
Alcalinidade	Coeficiente correlação	-0,889**	0,321	0,729**	-0,800**	0,461	0,936**	0,811**	-		
	Significância	0,000	0,243	0,002	0,000	0,084	0,000	0,000			
	R ²	0,436	0,029	0,585	0,441	0,126	0,571	0,477			
N	Coeficiente correlação	-0,916**	0,431	0,508*	-0,865**	0,538*	0,894**	0,874**	0,875**	-	
	Significância	0,000	0,096	0,045	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000		
	R ²	0,457	0,203	0,210	0,515	0,220	0,577	0,528	0,666		
Na	Coeficiente correlação	-0,921**	0,647**	0,638**	-0,947**	0,706**	0,894**	0,956**	0,711**	0,819**	-
	Significância	0,000	0,007	0,008	0,000	0,002	0,000	0,000	0,003	0,00	
	R ²	0,864	0,354	0,436	0,829	0,623	0,928	0,875	0,330	0,341	

* Correlação significativa no nível 0,05 (bilateral).

** Correlação significativa no nível 0,01 (bilateral).

Na figura 11 as linhas a verde representam correlações positivas e as linhas vermelhas representam correlações negativas. As correlações positivas observaram-se entre a concentração de células e o Mg, a concentração de células e o Na, a concentração de células e o K, a concentração de células e o SO_4^{2-} , o índice de Shannon-Weaver (H') e o Mg, o índice de Shannon-Weaver (H') e o Na, o índice de Shannon-Weaver (H') e o N, o índice de Shannon-Weaver (H') e a alcalinidade, o índice de Shannon-Weaver (H') e SO_4^{2-} , o Mg e o Na, o Mg e o N, o Mg e a alcalinidade, o Mg e o K, o Mg e SO_4^{2-} , o Na e o N, o N e a alcalinidade, o Na e o K, o Na e o SO_4^{2-} , o N e a alcalinidade, o N e o SO_4^{2-} , a alcalinidade e o SO_4^{2-} , o K e o SO_4^{2-} e a profundidade e o Ba. As correlações negativas observaram-se entre a profundidade e a concentração de células, a profundidade e o Mg, a profundidade e o Na, a profundidade e o N, a profundidade e a alcalinidade, a profundidade e o K, a profundidade e o SO_4^{2-} , a profundidade e o índice de Shannon-Weaver (H'), o Ba e a concentração de células, o Ba e o Mg, o Ba e o Na, o Ba e o N, o Ba e a alcalinidade, o Ba e o K, o Ba e o SO_4^{2-} e o Ba e o índice de Shannon-Weaver (H').

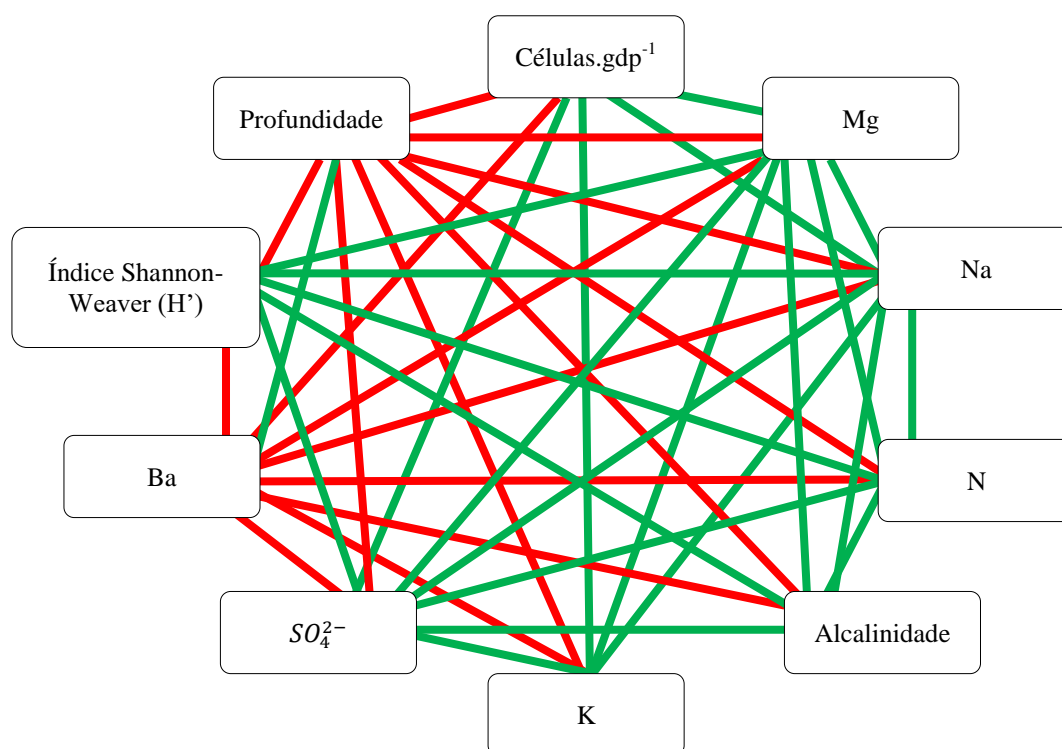


Figura 11. Representação esquemática das correlações significativas entre a profundidade, concentração de células, índice de Shannon-Heaver (H') e parâmetros físico-químicos Ba, Mg, K, SO_4^{2-} , Na, N e alcalinidade. A verde estão representadas correlações positivas e a vermelho correlações negativas.

4. Discussão

4.1. Diversidade estrutural das comunidades de *Bacteria*

A diversidade estrutural das comunidades de *Bacteria* nos sedimentos subsuperficiais provenientes da bacia Amami-Sankaku (Mar das Filipinas) foi avaliada por *Nested* PCR-DGGE, a partir de fragmentos de genes de 16S rRNA. A vantagem da utilização do *Nested* PCR é a mais eficiente amplificação de fragmentos de genes 16S rRNA, que posteriormente podem ser utilizados no DGGE (77). A extração de DNA e a amplificação foram bem sucedidas, sendo observável um número elevado de bandas correspondentes a diferentes ribótipos. Os perfis obtidos indicam uma alteração da estrutura das comunidades em função da profundidade. Um só ribótipo foi encontrado em todas as amostras, podendo corresponder a um grupo taxonómico ubíquo em sedimentos subsuperficiais profundos ou a uma contaminação. No entanto, o número de bandas foi menor (presença de 2 a 3 bandas) nos perfis correspondentes às amostras de maior profundidade (dos 180 aos 880 m), apesar de uma das bandas ter apresentado uma forte intensidade nas amostras B23X3, D24R1 e D40R5. Observa-se uma redução da diversidade em função da profundidade, sendo as comunidades dominadas por um grupo mais restrito de unidades taxonómicas (grupos dominantes) que se encontram bem representadas.

A diversidade das comunidades de *Bacteria* ao longo do perfil vertical de profundidade foi avaliada através do índice de Shannon-Weaver (H'). Quanto mais elevado o valor de H' maior será a diversidade da comunidade em estudo, tendo em conta um igual peso entre espécies raras e abundantes (78). Verificou-se que as amostras de sedimentos mais superficiais (0 – 51 mafm) apresentaram um H' mais elevado do que amostras de sedimentos profundos (170 – 880 mafm), o que é indicativo da ocorrência de comunidades mais diversas até à profundidade de 51 mafm. Pelo cálculo da média de H' entre as profundidades 0–150 mafm, 150–180 mafm e 180–880 mafm, verificou-se que o grupo de sedimentos mais superficiais apresentou H' médio de 2,40 sendo este valor mais elevado do que nas camadas mais profundas (2,32 e 1,58, respetivamente). O

valor do coeficiente de correlação entre os logs de H' e profundidade foi de $-0,688$ ($p \leq 0,01$; $R^2 = 0,431$), confirmando a relação inversa entre a diversidade estrutural das comunidades de *Bacteria* e a profundidade.

Num estudo anterior realizado em sedimentos da Antártida verificou-se um decréscimo de H' com a profundidade em sedimentos SSP de profundidades 0-1,53 mafm (17). Até aos 1,20 mafm o valor de H' situou-se entre 5,0 e 4,0, diminuindo a partir dessa profundidade para valores de 2,0. Apesar de se tratar de sedimentos muito menos profundos, é de salientar o rápido decréscimo de H' com a profundidade, tal como observado neste estudo. Na expedição 302 do IODP na cordilheira Lomonosov (Bacia do Ártico), foram extraídos sedimentos SSP a 55, 103 e 242 mafm, tendo-se obtido valores de H' para as comunidades de *Bacteria* de 0,65, 0,18 e 0,81, respetivamente (79). Em comparação com os valores de H' obtidos neste estudo (2,39; 2,35; entre 1,93 e 1,75)), para profundidades semelhantes, verificamos que estes correspondem a comunidades mais diversas. Os valores de H' obtidos (2,5 – 2,9) em sedimentos recolhidos na expedição 1230 do ODP de uma zona interplacas, no Peru, a profundidades dos 0 aos 35 mafm (80), situam-se dentro da mesma gama obtida no presente estudo, em sedimentos de idêntica profundidade (2,7 – 3,1).

Nas amostras B10H4, B18H3 e D62R1 provenientes das profundidades de 89, 162 e 792 mafm, respetivamente, os valores de H' registados contrariam a tendência de decréscimo da diversidade com o aumento da profundidade. Nesta gama de profundidades poderá ocorrer uma transição geoquímica, com consequente diversificação de vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos. A zona de descontinuidade acontece quando a concentração de sulfato atinge praticamente o nível mínimo e esta correlaciona-se positivamente com o H' (0,676; $p \leq 0,01$; $R^2 = 0,490$) e negativamente com a profundidade ($-0,971$; $p \leq 0,01$; $R^2 = 0,973$), verificando-se, no entanto, um aumento da concentração de bário, o único parâmetro físico-químico a correlacionar-se positivamente com a profundidade (0,944; $p \leq 0,01$; $R^2 = 0,728$) e negativamente com o H' ($-0,606$; $p \leq 0,05$; $R^2 = 0,367$). É conhecida a existência de bactérias sulfato-redutoras que utilizam o sulfato de bário (forma muito pouco solúvel) como aceitador de eletrões, com a libertação de bário em meio redutor (81). A ocorrência de comunidades

capazes de utilizar sulfato de bário pode estar relacionada com a descontinuidade microbiológica observada. No entanto, neste estudo foi observada uma elevada concentração de sulfato em solução em condições oxidativas, o que sugere que as comunidades de *Bacteria* provavelmente optarão pela utilização do sulfato disponível em solução ao invés de formas menos solúveis. Uma abordagem baseada na sequenciação avançada poderá ajudar a perceber se a alteração nas comunidades existe de facto. Uma outra hipótese poderá basear-se no facto de, nestas zonas de transição, se desenvolvem comunidades especializadas e adaptadas às condições físico-químicas prevalentes, reguladas por fatores distintos dos que regulam a distribuição e atividades dos procariotas nos sedimentos imediatamente acima e abaixo (38).

No tratamento dos dados do DGGE optou-se pela utilização da distância Bray-Curtis devido à sua elevada aplicabilidade ecológica (82,83) e utilizou-se a ordenação PCO pelo facto de permitir a utilização de valores provenientes de uma matriz de distâncias (84). A ordenação dos perfis DGGE por PCO revelou uma sequência de comunidades cuja estrutura é mais semelhante em zonas da mesma gama de profundidade. Verifica-se que as comunidades definem dois grandes *clusters*: um correspondente a profundidades <140 m, à esquerda da origem do eixo das abcissas e outro correspondente a profundidades >420 m, à direita da origem do eixo das abcissas. Algumas amostras situaram-se na região intermedia da ordenação, nomeadamente as que correspondem a profundidades intermédias (B18H3, B20F2 e B23X3). Isto poderá dever-se a possuírem comunidades mistas com grupos taxonómicos comuns às amostras das gamas de profundidades superiores e inferiores.

A ordenação dos perfis DGGE do subconjunto de amostras para os quais estavam disponíveis dados de caracterização físico-química e os vetores dos parâmetros físico-químicos que apresentaram uma significância estatística ($p \leq 0,1$) quanto à correlação com a distribuição das amostras, foram analisados em conjunto, permitindo perceber a relação entre os parâmetros físico-químicos e os *clusters* de amostras. A correlação entre os parâmetros físico-químicos e a ordenação das amostras foi calculada com base na distribuição dos primeiros ao longo da coluna de sedimentos. Os que apresentaram uma distribuição nos

sedimentos semelhante à encontrada nos *clusters* formados no PCO explicaram de melhor forma essa ordenação ($p \leq 0,1$). A concentração de sulfato aparece significativamente associada ao *cluster* de amostras superficiais (<140m). Na ausência de oxigênio, o sulfato é o mais importante aceitador de elétrons para as bactérias heterotróficas de sedimentos marinhos. Concretamente, nas zonas interplacas, em sedimentos marinhos de menor profundidade, o sulfato representa o papel de um dos principais aceitadores de elétrons e uma das principais vias metabólicas de obtenção de energia (11) e a sua concentração vai diminuindo com a profundidade (58), o que poderá explicar a maior diversidade bacteriana a menores profundidades, refletindo uma maior diversidade metabólica dentro da comunidade (85). No entanto, na bacia Amani-Sankaku não é conhecida a concentração de oxigênio dissolvido assim como a relevância de aceitadores de elétrons preferenciais ao sulfato, como o manganês (IV) ou o ferro (III), dado que estes não apresentaram correlações significativas com os parâmetros microbiológicos. Nos sedimentos marinhos, a zona de transição sulfato-metano (SMTZ) (86) é a zona onde ocorre simultaneamente a redução de sulfato e a metanogénese (87,88). Esta interface deve-se à atividade metabólica procariota, no nível superior, pelo metabolismo associado à redução do sulfato e, no nível inferior, pela metanogénese (89). Em sedimentos de oceano aberto, com um baixo teor de matéria orgânica, a SMTZ foi detetada a 35 mfm (89). No entanto, em sedimentos da bacia de Skagerrak (Dinamarca), com um maior teor de matéria orgânica, essa zona foi detetada a 0,7 mfm (90). Neste estudo não se atingiu a SMTZ. No entanto, as populações de *Bacteria* podem estar representadas numa sucessão de adaptação às formas de sulfato disponíveis, mantendo contudo a redução de sulfato como principal via de obtenção de energia. Outra hipótese que poderá explicar a variação da diversidade de *Bacteria* poderá basear-se na redução do manganês (IV), cuja concentração apresenta picos distintos em função do aumento da profundidade. Apesar disso, esse parâmetro não apresentou qualquer correlação significativa com a profundidade ou com o índice de diversidade.

A maioria dos estudos de comunidades de *Bacteria* em sedimentos baseiam-se numa abordagem de análise tendo como alvo o DNA. No entanto, é consensual

que os perfis obtidos a partir de fragmentos 16S rRNA, provenientes da análise de DNA, exprimem as comunidades totais presentes em cada amostra, incluindo microrganismos mortos ou em estado de dormência. Por sua vez, uma análise baseada em RNA é apenas representativa das comunidades metabolicamente ativas e, sendo assim, mais indicada para um estudo com vista a avaliar o impacto metabólico dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos (91). Apesar disso, o RNA é muito mais suscetível à degradação do que o DNA e é rapidamente degradado quando se dá a morte das células (92). Neste estudo, a tentativa de extração e amplificação de RNA não teve sucesso e não se sabe se grande parte das bactérias possam estar em estado dormente ou mortas, mantendo apenas o seu DNA (93), podendo-se estar na presença de um necrobioma e não de um microbioma ativo. Considerando os indícios que apontam para níveis de atividade muito baixos nas comunidades de procariotas de sedimentos SSP, é de esperar que as concentrações de RNA sejam extremamente baixas, o que coloca problemas de extração e torna também particularmente crítica a questão das possíveis contaminações durante o processo de preparação das amostras. A dificuldade em extrair ácidos nucleicos de sedimentos que contêm uma reduzida concentração de células ou biomassa é frequentemente apontada como a principal causa do insucesso da extração e da amplificação (18,33,94).

Uma das implicações da metodologia baseada em *Nested* PCR-DGGE é que esta só abrange as populações mais representativas de uma comunidade, acabando por não se conseguir detetar taxa menos abundantes. Algumas destas espécies, apesar da pouca abundância, poderão ter um papel ecológico importante (95). Uma alternativa ou procedimento posterior à análise *Nested* PCR-DGGE seria a sequenciação dos produtos de amplificação, através de técnicas de sequenciação avançada. Esta metodologia permite a identificação de milhares de sequências por amostra, permitindo a análise de comunidades bacterianas ao nível da espécie (96,97). Dado que os sedimentos SSP possuem grupos taxonómicos pouco abundantes mas possivelmente de grande importância ao nível biogeoquímico (18,94), a sequenciação dos produtos de amplificação derivados da análise *Nested* PCR poderá revelar a estrutura destas comunidades.

Apesar de neste estudo não ter sido possível incluir a análise da diversidade estrutural das comunidades de *Archaea*, a informação disponível na literatura específica de alguns sedimentos SSP aponta para uma abundância de *Archaea* equivalente, ou mesmo superior à de *Bacteria* (60,98–100) embora o decréscimo com a profundidade ao longo dos primeiros 10 mafm possa ser menos acentuado (100).

O domínio *Archaea* também foi alvo de amplificação e análise DGGE, mas a sua análise não foi incluída neste estudo devido a não se ter obtido resultados que pudessem validar a sua discussão. A presença de bandas inespecíficas e contaminações remeteram o seu estudo para uma abordagem posterior.

4.2. Abundância e distribuição de procariotas

De forma a complementar os resultados da análise da diversidade estrutural das comunidades DGGE estimou-se a abundância total de procariotas pela técnica de microscopia de epifluorescência. Recorreu-se ao fluorocromo laranja de acridina por ainda ser utilizado na contagem do número total de células pelo método de contagem directa (2) em amostras ambientais (101,102). Este composto liga-se aos ácidos nucleicos conferindo-lhes fluorescência e permitindo a sua contagem num microscópio de epifluorescência (103), não distinguindo entre células vivas, mortas ou em estado de dormência (16,104).

Nas amostras em estudo a presença de partículas de sedimento no campo de contagem e a agregação das células a essas partículas constituiu uma dificuldade no processo de contagem do número de células. Assim, de modo a garantir-se uma concentração de células superior ao limite de deteção conhecido (10^5 células.cm⁻³) (105) e obter-se uma maior sensibilidade e precisão, adaptou-se a metodologia de extração proposta por Kallmeyer et al. (106) e que envolve a separação mecânica das células e a remoção de detritos. Uma separação mecânica baseada no tratamento com ultrassons permitiu desagregar as células das partículas de sedimento, seguida de uma centrifugação que permitiu concentra-las no sobrenadante, descartando-se o *pellet* de sedimento. Num estudo de sedimentos recolhidos na expedição ACEX do IODP, na bacia do

Oceano Ártico, a profundidades de 55, 103 e 242 mafm foram registados valores de abundância de $2,3 \times 10^7$, $2,7 \times 10^7$ e $1,2 \times 10^7$ células.cm⁻³, respetivamente. Apesar de ter havido um pequeno aumento da concentração de células dos 55 aos 103 mafm, houve uma grande diminuição dos 103 aos 242 mafm (106). Nos sedimentos recolhidos deste estudo, a abundância variou entre $8,66 \times 10^6$ células.gps⁻¹ (máximo), a uma profundidade de 67 mafm, e $2,26 \times 10^6$ células.gps⁻¹ (mínimo), a uma profundidade de 879 mafm, ou seja, numa ordem de grandeza dez vezes menor em relação aos resultados da expedição ACEX do IODP. Por outro lado, tal como evidenciado nos sedimentos provenientes do Oceano Ártico, a abundância verificada neste estudo demonstrou uma tendência de diminuição ao longo do perfil vertical de sedimentos. Deste modo, conclui-se que, tal como a diversidade, também a abundância diminui com o aumento da profundidade, existindo uma forte correlação negativa entre ambas ($-0,621$; $p \leq 0,01$; $R^2 = 0,418$). A redução da abundância total de procariotas com a profundidade corresponde a um padrão observado em vários tipos de sedimentos SSP (2,15,58). Esta variação é normalmente explicada pela variação da disponibilidade de matéria orgânica e de aceptadores de eletrões, como o manganês, o ferro ou o sulfato (30,47,107).

Os picos de abundância que contrariaram o padrão vertical de decréscimo de abundância com o aumento da profundidade foram observados nas amostras B6H4, B8H2, B16H3 e B20F2, a 51, 67, 144 e 171 mafm, respetivamente. Num outro estudo, em amostras de sedimentos marinhos provenientes da zona interplacas do Peru, foram registadas populações de bactérias a 80 mafm após um decréscimo da concentração de células (108), contrariando a ideia de que a abundância de microrganismos diminui continuamente ao longo da profundidade. Como já discutido anteriormente, relativamente à relação entre a diversidade e as concentrações de sulfato e de bário, também as descontinuidades verificadas na abundância total de procariotas poderão estar relacionadas com a alteração de vias metabólicas das comunidades presentes nestes sedimentos. A concentração de células correlacionou-se positivamente com a concentração de sulfato ($0,597$; $p \leq 0,05$; $R^2 = 0,405$) e negativamente com a concentração de bário ($-0,579$; $p \leq 0,05$; $R^2 = 0,275$), tal como H'. Isto poderá ser mais uma evidência da alteração da

diversidade e abundância e com a utilização de formas de sulfato menos solúveis (ex: BaSO_4), sabendo no entanto que este deverá ser um processo bastante improvável na bacia Amani-Sankaku. Uma abordagem baseada nas tecnologias de sequenciação avançada, assim como em métodos que permitam avaliar a abundância de *Bacteria* e *Archaea* separadamente, poderão ajudar a perceber como estão organizadas as comunidades de procariotas nestes sedimentos.

4.3. Conclusão

Os resultados do estudo da abundância e diversidade estrutural das comunidades de procariotas em sedimentos sub-superficiais profundos colhidos no local U1438, na bacia Amami-Sankaku, revelaram a presença de células procariotas até à profundidade de 880 mfm. A abordagem à diversidade estrutural das comunidades de *Bacteria* por *Nested* PCR-DGGE, revelou uma sucessão de comunidades estruturalmente distintas, sendo as maiores diferenças observadas entre as comunidades das camadas mais superficiais e mais profundas.

Os perfis de variação vertical da abundância e do valor de H' , tomado como estimativa da diversidade, revelaram correlações negativas entre estes dois descritores microbiológicos e a profundidade, o que reflete provavelmente a diminuição da disponibilidade de matéria orgânica, enquanto fonte de carbono, e de sulfato ou de outras espécies químicas, enquanto aceptadores de eletrões. Na região intermédia do perfil vertical, verifica-se uma descontinuidade no padrão de variação dos parâmetros microbiológicos, ocorrendo um aumento localizado da abundância e do índice de diversidade. Esta alteração ao padrão vertical, pode estar relacionada com uma transição no ambiente geoquímico, nomeadamente com a transição entre a utilização de diferentes formas de sulfato e pela coocorrência de populações especializadas. No entanto, dadas as características físico-químicas da bacia Amani-Sankaku, é provável que a explicação para a variação da abundância e da diversidade microbiológicas se baseie na utilização de outros aceptadores de eletrões que não o sulfato. É possível que as condições abióticas a profundidades elevadas tenham exercido uma pressão evolutiva, promovendo a especificidade das comunidades.

Considerando que baixa atividade metabólica dos microrganismos de sedimentos SSP e as condições físico-químicas extremas a que estão sujeitos, é possível que uma grande parte do microbioma seja constituída por células dormentes. A abordagem dependente do DNA, aplicada neste estudo, para a análise da diversidade estrutural, não permite esclarecer a contribuição relativa dos grupos taxonómicos detetados para os ciclos biogeoquímicos em sedimentos SSP. No entanto, a análise das amostras por técnicas de sequenciação avançada, e especialmente, a análise baseada em RNA, poderá no futuro, contribuir para uma melhor compreensão da estrutura das comunidades de procariotas e para a identificação dos principais agentes e processos de obtenção de energia.

5. Referências

1. Furnes H, Staudigel H. Biological mediation in ocean crust alteration: How deep is the deep biosphere? *Earth Planet Sci Lett.* 1999;166(3-4):97–103.
2. Parkes RJ, Cragg BA, Fry JC, Herbert RA, Wimpenny JWT. Bacterial biomass and activity in deep sediment layers from the Peru margin. *Philos Trans R Soc London A Math Phys Eng Sci.* 1990;139–53.
3. ZoBell CE, Anderson DQ. Vertical Distribution of Bacteria in Marine Sediments. *Am Assoc Pet Geol Bull. American Association of Petroleum Geologists;* 1936;20(3):258–69.
4. Morita RY, ZoBell CE. Occurrence of bacteria in pelagic sediments collected during the mid-Pacific expedition. *Deep Sea Res.* 1955;3(1):66–73.
5. Jannasch HW, Wirsen CO. Deep-Sea Microorganisms: In situ Response to Nutrient Enrichment. *Science (80-).* 1973;641–3.
6. Hamilton EL. Variations of Density and Porosity with Depth in Deep-sea Sediments. *J Sediment Res. Society for Sedimentary Geology;* 1976;46(2).
7. Hoehler TM, Jørgensen BB. Microbial life under extreme energy limitation. *Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group;* 2013;11(2):83–94.
8. Girguis PR, Cozen AE, DeLong EF. Growth and population dynamics of anaerobic methane-oxidizing archaea and sulfate-reducing bacteria in a continuous-flow bioreactor. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jul 1;71(7):3725–33.
9. D'Hondt S, Rutherford S, Spivack AJ. Metabolic Activity of Subsurface Life in Deep-Sea Sediments. *Science (80-).* 2002 Mar 15;295(5562):2067–70.
10. Hoehler TM, Jørgensen BB. Microbial life under extreme energy limitation. *Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.;* 2013 Feb;11(2):83–94.
11. Froelich PN, Klinkhammer GP, Bender ML, Luedtke NA, Heath GR, Cullen D, et al. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochim Cosmochim Acta.* 1979;43(7):1075–90.
12. Rothwell RG, Rack RF. New techniques in sediment core analysis : an introduction. *Geol Soc London, Spec Publ.* 2006;1–29.
13. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(12):6578–83.
14. Lipp JS, Morono Y, Inagaki F, Hinrichs K-U. Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved;* 2008 Aug 21;454(7207):991–4.
15. Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S. From the Cover: Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(40):16213–6.
16. Schippers A, Neretin LN, Kallmeyer J, Ferdeman TG, Cragg BA, Parkes RJ, et al. Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature.* 2005 Feb 24;433(7028):861–4.
17. Carr S a., Vogel SW, Dunbar RB, Brandes J, Spear JR, Levy R, et al. Bacterial abundance and composition in marine sediments beneath the

- Ross Ice Shelf, Antarctica. *Geobiology*. 2013;11(4):377–95.
18. Biddle JF, Lipp JS, Lever M a, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R, et al. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(10):3846–51.
19. Inagaki F, Nunoura T, Nakagawa S, Teske A, Lever M, Lauer A, et al. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 21;103(8):2815–20.
20. Ciobanu M-C, Burgaud G, Dufresne A, Breuker A, Rédou V, Ben Maamar S, et al. Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *ISME J*. 2014;8(7):1370–80.
21. Takami H, Inoue A, Fuji F, Horikoshi K. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jan 17;152(2):279–85.
22. Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap*. 2006 Jan 1;53(1):14–27.
23. Zhang D-C, Brouchkov A, Griva G, Schinner F, Margesin R. Isolation and characterization of bacteria from ancient siberian permafrost sediment. *Biology (Basel)*. 2013;2(1):85–106.
24. Clasen JL, Brigden SM, Payet JP, Suttle CA. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. *Freshw Biol*. 2008 Jun;53(6):1090–100.
25. Engelhardt T, Kallmeyer J, Cypionka H, Engelen B. High virus-to-cell ratios indicate ongoing production of viruses in deep subsurface sediments. *ISME J*. Nature Publishing Group; 2014;8(7):1–7.
26. Anderson RE, Brazelton WJ, Baross JA. The Deep Viriosphere: Assessing the Viral Impact on Microbial Community Dynamics in the Deep Subsurface. *Rev Mineral Geochemistry*. 2013;75(1):649–75.
27. Anderson RE, Brazelton WJ, Baross J a. Is the genetic landscape of the deep subsurface biosphere affected by viruses? *Front Microbiol*. 2011;2:1–16.
28. Bird DF, Juniper SK, Ricciardi-Rigault M, Martineu P, Prairie YT, Calvert SE. Subsurface viruses and bacteria in holocene/late pleistocene sediments of saanich inlet, BC: ODP holes 1033B and 1034B, Leg 169S. *Mar Geol*. 2001;174(1-4):227–39.
29. Dell'Anno A, Danovaro R. Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning. *Science (80-)*. 2005;309(5744):2179.
30. Fry JC, Parkes RJ, Cragg BA, Weightman AJ, Webster G. Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008 Nov;66(2):181–96.
31. Nobu MK, Dodsworth JA, Murugapiran SK, Rinke C, Gies EA, Webster G, et al. Phylogeny and physiology of candidate phylum “Atribacteria” (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *ISME J*. International Society for Microbial Ecology; 2015 Jun 19;
32. Webster G, Parkes RJ, Fry JC, Weightman AJ, Weightman J. Widespread Occurrence of a Novel Division of Bacteria Identified by 16S rRNA Gene Sequences Originally Found in Deep Marine Sediments. *Appl Environ*

- Microbiol. 2004;70(9):5708–13.
33. Von Der Weid I, Korenblum E, Jurelevicius D, Rosado AS, Dino R, Sebastián GV, et al. Molecular diversity of bacterial communities from subseafloor rock samples in a deep-water production basin in Brazil. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(1):5–14.
 34. Parkes RJ, Webster G, Cragg BA, Weightman AJ, Newberry CJ, Ferdelman TG, et al. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature.* 2005 Jul 21;436(7049):390–4.
 35. Polymenakou PN, Christakis C a, Mandalakis M, Oulas A. Pyrosequencing analysis of microbial communities reveals dominant cosmopolitan phylotypes in deep-sea sediments of the eastern Mediterranean Sea. *Res Microbiol. Elsevier Masson SAS;* 2015;(April):1–10.
 36. Santoro AE, Casciotti KL, Francis CA. Activity, abundance and diversity of nitrifying archaea and bacteria in the central California Current. *Environ Microbiol.* 2010;12(7):1989–2006.
 37. Postgate JR, Hunter JR. Acceleration of Bacterial Death by Growth Substrates. *Nature.* 1963;198(4877):273–273.
 38. Süß J, Engelen B, Cypionka H, Sass H. Quantitative analysis of bacterial communities from Mediterranean sapropels based on cultivation-dependent methods. *FEMS Microbiol Ecol. The Oxford University Press;* 2004 Dec 27;51(1):109–21.
 39. Phelps TJ, Murphy EM, Pfiffner SM, White DC. Comparison Between Geochemical and Biological Estimates of Subsurface Microbial Activities. *Microb Ecol.* 1994;349:335–49.
 40. Stein R, Blackman DK, Inagaki F, Larsen H-C. Earth and Life Processes Discovered from Subseafloor Environments: A Decade of Science Achieved by the Integrated Ocean Drilling Program (IODP). *Elsevier Science;* 2014. 822 p.
 41. D'Hondt S, Spivack AJ, Pockalny R, Ferdelman TG, Fischer JP, Kallmeyer J, et al. Subseafloor sedimentary life in the South Pacific Gyre. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11651–6.
 42. Røy H, Kallmeyer J, Adhikari RR, Pockalny R, Jørgensen BB, D'Hondt S. Aerobic Microbial Respiration in 86-Million-Year-Old Deep-Sea Red Clay. *Science (80-).* 2012 May 18;336(6083):922–5.
 43. Ward BB, Capone DG, Zehr JP. What's New in the Nitrogen Cycle? *Oceanography.* 2007. p. 101–9.
 44. Karl DM, Church MJ, Dore JE, Letelier RM, Mahaffey C. Predictable and efficient carbon sequestration in the North Pacific Ocean supported by symbiotic nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;1842–9.
 45. Raven JA, Falkowski PG. Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* 1999;741–55.
 46. Zehr JP, Kudela RM. Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. *Ann Rev Mar Sci. Annual Reviews;* 2011 Dec 15;3(1):197–225.
 47. D'Hondt S, Jørgensen BB, Miller DJ, Batzke A, Blake R, Cragg BA, et al. Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science (80-).* 2004 Dec 24;306(5705):2216–21.
 48. Hinrichs K-U, Hayes JM, Bach W, Spivack AJ, Hmelo LR, Holm NG, et al. Biological formation of ethane and propane in the deep marine subsurface.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(40):14684–9.
49. Glud RN. Oxygen dynamics of marine sediments. *Mar Biol Res.* 2008;243–89.
 50. Revsbech NP, Sørensen N J, Blackburn TH, Lomholt JP. Distribution of oxygen in marine sediments measured with microelectrodes. *Limnol Oceanogr.* 1980;25(3):403–11.
 51. Shaw TJ, Gieskes JM, Jahnke RA. Early diagenesis in differing depositional environments: The response of transition metals in pore water. *Geochim Cosmochim Acta.* 1990 May;54(5):1233–46.
 52. Jørgensen BB, Parkes RJ. Role of sulfate reduction and methane production by organic carbon degradation in eutrophic fjord sediments (Limfjorden, Denmark). *Limnol Oceanogr.* 2010;1338–52.
 53. Jørgensen BB. Bacteria and marine biogeochemistry. *Marine geochemistry.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2000. p. 173–207.
 54. Böttcher ME, Ferdelman TG, Jørgensen BB, Blake RE, Surkov A V., Claypool GE. Sulfur Isotope Fractionation by the Deep Biosphere within Sediments of the Eastern Equatorial Pacific and Peru Margin. *Proc Ocean Drill Program, Sci Results.* 2006;201:1–21.
 55. Lovley DR, Chapelle FH. Deep Subsurface Microbial Processes. *Rev Geophys.* 1995;33(3):365–81.
 56. Fitz RM, Cypionka H. Formation of thiosulfate and trithionate during sulfite reduction by washed cells of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Arch Microbiol.* 1990 Sep;154(4):400–6.
 57. Broco M, Rousset M, Oliveira S, Rodrigues-Pousada C. Deletion of flavoredoxin gene in *Desulfovibrio gigas* reveals its participation in thiosulfate reduction. *FEBS Lett.* 2005 Aug 29;579(21):4803–7.
 58. Cragg BA, Harvey SM, Fry JC, Herbert RA, Parkes RJ. Bacterial Biomass and Activity in the Deep Sediment Layers of the Japan Sea, Hole 798B. *Proc Ocean Drill Progr.* 1992;127/128:761–76.
 59. Guan Y, Hikmawan T, Antunes A, Ngugi D, Stingl U. Diversity of methanogens and sulfate-reducing bacteria in the interfaces of five deep-sea anoxic brines of the Red Sea. *Res Microbiol.* 2015;1–12.
 60. Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R, et al. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 7;103(10):3846–51.
 61. Thauer RK, Hedderich R, Fischer R. Reactions and Enzymes Involved in Methanogenesis from CO₂ and H₂. Ferry JG, editor. Boston, MA: Springer US; 1993.
 62. Newberry CJ, Webster G, Cragg BA, Parkes RJ, Weightman AJ, Fry JC. Diversity of prokaryotes and methanogenesis in deep subsurface sediments from the Nankai Trough, Ocean Drilling Program Leg 190. *Environ Microbiol.* 2004 Mar;6(3):274–87.
 63. Kennett JP, Cannariato KG, Hendy IL, Behl RJ. Methane Hydrates in Quaternary Climate Change The Clathrate Gun Hypothesis. 2002. 219 p.
 64. Arculus RJ, Ishizuka O, Bogus K, Aljahdali MH, Bandini-Maeder AN, Barth AP, et al. Site U1438. *Int Ocean Discov Progr Proceedings.* 2015;351.
 65. Boon N, Windt W De, Verstraete W, Top EM. Evaluation of nested PCR - DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S

- rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. Elsevier. 2002;39:101–12.
66. Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonça-Hagler L, Smalla K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. Powlson D, Bateman G, Davies K, Gaunt J, Hirsch P, editors. Plant Soil. Springer Netherlands; 2002;96(1):167–80.
 67. Madrid VM, Taylor GT, Scranton MI, Chistoserdov AY. Phylogenetic Diversity of Bacterial and Archaeal Communities in the Anoxic Zone of the Cariaco Basin Phylogenetic Diversity of Bacterial and Archaeal Communities in the Anoxic Zone of the Cariaco Basin †. Appl Environ Microbiol. 2001;67(4):1663–74.
 68. Weinbauer MG, Fritz I, Wenderoth DF, Höfle MG. Simultaneous Extraction from Bacterioplankton of Total RNA and DNA Suitable for Quantitative Structure and Function Analyses. Appl Environ Microbiol. 2002;68(3):1082–7.
 69. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EMH. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Appl Environ Microbiol. 1997;63(8):3233–41.
 70. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 1993 Mar 1;59(3):695–700.
 71. Heuer H, Wieland J, Schönfeld J, Schönwalder A, Gomes NCM, Smalla K. Paul A. Rochelle (ed): Environmental molecular microbiology: protocols and applications. Int Microbiol. Springer-Verlag; 2001;4(4):264.
 72. Oksanen AJ, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, Hara RBO, et al. Community Ecology Package: Vegan. Version 2.3-0. 2015;
 73. Marion AZ, Fordyce J, Fitzpatrick B, Marion MZ. Package “hierDiversity.” 2015;1–10.
 74. Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S. Use of nucleopore filter counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol. 1977;33:1225–8.
 75. Cunha MA, Pedro R, Almeida MA, Silva MH. Activity and growth efficiency of heterotrophic bacteria in a salt marsh (Ria de Aveiro, Portugal). Microbiol Res. 2005;160:279–90.
 76. Almeida MA, Alcantara F. Bacterial colonization of seston particles in brackish waters (Ria de Aveiro, Portugal). Mar Ecol Prog Ser. 1992;89:165–73.
 77. Cleary DFR, Smalla K, Mendonça-Hagler LCS, Gomes NCM. Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. PLoS One. Public Library of Science; 2012 Jan;7(1):e29380.
 78. Shannon CE, Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. Bell Syst Tech J. 1949;379–423, 623–56.
 79. Forschner SR, Sheffer R, Rowley DC, Smith DC. Microbial diversity in Cenozoic sediments recovered from the Lomonosov Ridge in the Central Arctic basin. Environ Microbiol. 2009;11(3):630–9.

80. Biddle J. Microbial Populations and Processes in Subseafloor Marine Environments. 2006.
81. Karnachuk O V., Kurochkina SY, Tuovinen OH. Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Mar;58(4):482–6.
82. Gomes NCM, Cleary DFR, Pinto FN, Egas C, Almeida A, Cunha A, et al. Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010 Nov 22;5(11):e14065.
83. Legendre P, Gallagher E. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*. Springer-Verlag; 2001;129(2):271–80.
84. Ter Braak CJF, Van Tongeren OFR. *Data Analysis in Community and Landscape Ecology*. 1995.
85. Webster G, Rinna J, Roussel EG, Fry JC, Weightman AJ, Parkes RJ. Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable-isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010;72(2):179–97.
86. Reeburgh WS. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev*. American Chemical Society; 2007 Feb;107(2):486–513.
87. Iversen N, Jørgensen BB. Anaerobic methane oxidation rates at the sulfate-methane transition in marine sediments from Kattegat and Skagerrak (Denmark). *Limnol Oceanogr*. 1985;30(5):944–55.
88. Treude T, Niggemann J, Kallmeyer J, Wintersteller P, Schubert CJ, Boetius A, et al. Anaerobic oxidation of methane and sulfate reduction along the Chilean continental margin. *Geochim Cosmochim Acta*. 2005 Jun;69(11):2767–79.
89. Parkes RJ, Webster G, Cragg BA, Weightman AJ, Newberry CJ, Ferdelman TG, et al. Deep sub-seafloor prokaryotes stimulated at interfaces over geological time. *Nature*. 2005 Jul 21;436(7049):390–4.
90. Parkes RJ, Cragg BA, Banning N, Brock F, Webster G, Fry JC, et al. Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol*. 2007 May;9(5):1146–61.
91. Lillis L, Doyle E, Clipson N. Comparison of DNA- and RNA-based bacterial community structures in soil exposed to 2,4-dichlorophenol. *J Appl Microbiol*. 2009;107:1883–93.
92. Davis BD, Luger SM, Tai PC. Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*. 1986;166(2):439–45.
93. Kjelleberg S. Surviving starvation. *Trends Microbiol*. 1998;6(6):251.
94. Teske AP. Microbial Communities of Deep Marine Subsurface Sediments: Molecular and Cultivation Surveys. *Geomicrobiol J*. Taylor & Francis Group; 2006 Sep 6;23(6):357–68.
95. Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(8):3233–41.
96. Keijser BJF, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the Oral Microflora of healthy

- adults. *J Dent Res*. 2008 Nov 1;87(11):1016–20.
97. Zaura E, Keijser BJF, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009 Jan;9(1):259.
 98. Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*. 2001 Jan 25;409(6819):507–10.
 99. Schippers A, Neretin LN, Kallmeyer J, Ferdelman TG, Cragg BA, Parkes RJ, et al. Prokaryotic cells of the deep sub-sea oor biosphere identified as living bacteria. *Nature*. 2005;861–4.
 100. Lloyd KG, May MK, Kevorkian RT, Steen AD. Meta-Analysis of Quantification Methods Shows that Archaea and Bacteria Have Similar Abundances in the Subseafloor. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(24):7790–9.
 101. Schreier S, Doungchawee G, Triampo D, Wangroongsarb P, Hartskeerl RA, Triampo W. Development of a magnetic bead fluorescence microscopy immunoassay to detect and quantify *Leptospira* in environmental water samples. *Acta Trop*. 2012 Apr;122(1):119–25.
 102. Cragg BA, Parkes RJ. Bacterial and Archaeal direct counts: a faster method of enumeration, for enrichment cultures and aqueous environmental samples. *J Microbiol Methods*. 2014 Mar;98:35–40.
 103. McMaster GK, Carmichael GG. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Nov;74(11):4835–8.
 104. Jones JG, Simon BM. An Investigation of Errors in Direct Counts of Aquatic Bacteria by Epifluorescence Microscopy, with Reference to a New Method for Dyeing Membrane Filters. *J Appl Bacteriol*. Blackwell Publishing Ltd; 1975;39(3):317–29.
 105. Parkes RJ, Cragg BA, Wellsbury P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeol J*. Springer-Verlag; 2000;8(1):11–28.
 106. Kallmeyer J, Smith DC, Spivack AJ, D’Hondt S. New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnol Oceanogr*. 2008;6:236–45.
 107. Danovaro R, Marrale D, Dell’Anno A, Tselepides A, Fabiano M. Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. *Prog Oceanogr*. 2000;46(2-4):345–66.
 108. Cragg BA, Parkes RJ, Fry JC, Herbert RA, Wimpenny JWT, Getliff JM. Bacterial biomass and activity profiles within deep sediment layers. *Proceedings of the Ocean Drilling Program Scientific Results*. Ocean Drilling Program; 1990.

Anexos

Anexo 1. Identificação das amostras colhidas para análises microbiológicas e respetiva caracterização físico-química total (64).

Amostras	Hole	Core	Profundidade (mbsf)	Peso húmido (g)	Peso seco (g)	Peso seco/Peso húmido	Alcalinidade (mM)	Amónio (ÅμM)	B (μM)	Ba (μM)	Brometo (mM)	Cálcio (mM)	Cloreto (mM)
B1H1top	B	1	0	13,153	6,383	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H1btm	B	1	0,45	13,153	6,383	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H2	B	1	0,95	13,153	6,383	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H3	B	1	1,45	13,153	6,383	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H4	B	1	2,85	13,153	6,383	0,49	3,048	292	568,674	0,574	0,85	11,512	557,4
B1H5	B	1	4,45	14,059	7,167	0,51	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H6	B	1	5,95	13,675	6,744	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H7	B	1	7,02	13,675	6,744	0,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B2H2	B	2	10,15	8,455	3,878	0,46	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B2H4	B	2	13,05	8,142	4,092	0,50	3,041	200,5	572,528	0,623	0,86	14,104	562,8
B2H6	B	2	16,06	10,428	5,837	0,56	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B4H4	B	4	32,05	11,715	5,739	0,49	2,845	256,5	552,914	0,516	0,87	17,542	567,4
B6H4	B	6	51,05	12,782	6,352	0,50	2,401	189,2	511	0,67	0,87	20,205	567,3
B8H2	B	8	67,02	12,021	5,73	0,48	2,15	179,6	512,843	0,64	0,86	22,43	565,3
B10H4	B	10	89,05	17,002	9,251	0,54	2,113	163,6	621,295	0,894	0,87	25,337	566,2
B12H4	B	12	108	10,592	5,732	0,54	1,877	143,8	635,465	0,958	0,86	29,124	564
B14H2	B	14	124	7,148	3,973	0,56	1,749	194,3	552,692	0,994	0,86	32,134	554,3
B16H3	B	16	144,5	9,327	4,7	0,50	1,695	205	554,565	1,179	0,85	37,652	548,1
B18H3	B	18	163,5	16,243	8,803	0,54	1,148	131,7	482,628	1,184	0,86	41,782	560,6
B20F2	B	20	171,7	16,063	8,532	0,53	0,772	231,5	419,611	1,139	0,88	42,61	566,3
B23X3	B	23	184,9	13,295	7,761	0,58	0,719	311,7	388,523	1,045	0,88	45,861	568,2
D24R1	D	24	423,72	9,827	7,513	0,76	NA	72,178	248,135	3,287	0,97	138,92	614,07
D40R5	D	40	583,58	13,095	10,035	0,77	0,559	59,309	327,276	3,797	1	204,09	647,54
D62R1	D	62	792,4	15,402	13,016	0,85	0,915	61,114	305,819	4,325	1,08	253,52	672,75
ESR2	E	5	879,21	15,115	12,057	0,80	0,926	NA	119,496	2,049	0,937	256,13	644,04

**Anexo 1. Identificação das amostras colhidas para análises microbiológicas e respetiva caracterização físico-química total (continuação)
(64).**

Amostras	Potássio (mM)	Lítio (µM)	Magnésio (mM)	Manganês (µM)	Fosfato (ÂµM)	Salinity	Silício (µM)	Sódio (mM)	Estrôncio (µM)	Sulfato (mM)	Azoto (wt%)	Carbono inorgânico (wt%)	Carbono orgânico (wt%)	Carbono total (wt%)
B1H1top	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H1btm	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H4	23,088	21,54	52,574	186,452	17,97	36,5	483,54	479,565	90,629	28,7	0,05	0,05	0,22	0,27
B1H5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B1H7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B2H2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B2H4	22,34	18,317	51,686	130,227	8,17	36,5	438,279	484,474	96,842	28,68	0,05	0,166	0,24	0,41
B2H6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
B4H4	22,981	20,723	48,922	115,354	6,06	37,5	477,182	485,146	103,177	28,29	0,05	0,015	0,18	0,2
B6H4	21,973	25,822	46,706	175,581	6,25	37,5	640,217	484,276	105,877	27,83	0,05	0,04	0,1	0,14
B8H2	21,626	29,02	44,342	190,251	1,79	36,5	697,081	483,597	109,918	27,38	0,04	0,05	0,08	0,13
B10H4	18,223	29,905	44,886	181,766	0,39	36,5	322,275	478,544	116,603	26,89	0,04	0,038	0,07	0,1
B12H4	16,972	30,92	43,033	204,818	0,43	36,5	256,52	471,588	119,125	26,38	0,04	0,014	0,07	0,08
B14H2	15,975	32,335	41,603	264,871	0,86	36	595,469	462,624	120,201	26,02	0,04	0,041	0,03	0,07
B16H3	12,808	29,889	40,281	277,516	0,34	36	515,094	445,334	128,151	25,2	0,03	0,044	0,03	0,07
B18H3	15,814	23,019	35,251	199,539	0,67	36,5	684,248	460,006	129,166	25,25	0	1,099	0,03	1,12
B20F2	17,167	20,086	32,945	154,175	0,62	37,5	588,806	468,264	127,954	25,49	0	1,43	0,51	1,94
B23X3	16,554	15,717	31,271	133,623	0,2	36,5	613,77	466,976	129,966	25,55	0	1,573	0,25	1,82
D24R1	3,403	2,349	1	13,32	NA	41	191,261	376,32	86,709	20,55	0	0,974	0,08	1,05
D40R5	1,075	11,339	0,47	2,652	0,94	44,5	172,241	281,5	25,098	20	0,02	1,256	0,08	1,33
D62R1	2,373	5,946	0,48	0,19	NA	46	96,872	200,62	63,169	18	0	0,033	0,02	0,05
E5R2	0,986	37,012	1,43	2,212	NA	46	114,687	160,93	36,265	15,59	0	0,019	-0,02	0

Anexo 2. Parâmetros analisados ou calculados para cada amostra. + representa a utilização da amostra no procedimento experimental indicado e - representa a sua não utilização.

	Método				
Amostras	DGGE	PCO	PCO + FQ	Índice S-W (H')	Abundância procariotas
B1H1top	+	+	-	-	-
B1H1btm	+	+	-	-	-
B1H2	+	+	-	-	-
B1H3	+	+	-	-	-
B1H4	+	+	+	+	+
B1H5	+	+	-	-	-
B1H6	+	+	-	-	-
B1H7	+	+	-	-	-
B2H2	+	+	-	-	-
B2H4	+	+	+	+	+
B2H6	+	+	-	-	-
B4H4	+	+	+	+	+
B6H4	+	+	+	+	+
B8H2	+	+	+	+	+
B10H4	+	+	+	+	+
B12H4	+	+	+	+	+
B14H2	+	+	+	+	+
B16H3	+	+	+	+	+
B18H3	+	+	+	+	+
B20F2	+	+	+	+	+
B23-3	+	+	+	+	+
D24R1	+	+	+	+	+
D40R5	+	+	+	+	+
D62R1	+	+	+	+	+
E5R2	+	+	+	+	+

Anexo 3. Amostras utilizadas na extração de DNA e quantidade extraída de cada amostra.

Amostras	Quantidade extraída (g)
B1H1top	0,5463
B1H1btm	0,5725
B1H2	0,5405
B1H3	0,5465
B1H4	0,5548
B1H5	0,5938
B1H6	0,5440
B1H7	0,5780
B2H2	0,5026
B2H4	0,5501
B2H6	0,5452
B4H4	0,6203
B6H4	0,5629
B8H2	0,5673
B10H4	0,6185
B12H4	0,5929
B14H2	0,5735
B16H3	0,5803
B18H3	0,5792
B20F2	0,5757
B23X3	0,5612
D24R1	0,5424
D40R5	0,5830
D62R1	0,5930
E5R2	0,5672